

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP  
INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

JOÃO VICTOR NARDUCCI FERREIRA

**INTERAÇÃO DO TIMOL COM MONOCAMADAS DE LANGMUIR APLICADA  
EM QUÍMICA DE SUPERFÍCIE E SIMULAÇÃO MOLECULAR**

Diadema, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP  
INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

JOÃO VICTOR NARDUCCI FERREIRA

**INTERAÇÃO DO TIMOL COM MONOCAMADAS DE LANGMUIR APLICADA  
EM QUÍMICA DE SUPERFÍCIE E SIMULAÇÃO MOLECULAR**

Trabalho de conclusão da unidade curricular Projetos Dirigidos em Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Profª Dr. Luciano Caseli

Diadema, 2020

## Ficha Catalográfica

### Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Ferreira, João Victor Narducci  
INTERAÇÃO DO TIMOL COM MONOCAMADAS DE LANGMUIR  
APLICADA EM QUÍMICA DE SUPERFÍCIE E SIMULAÇÃO  
MOLECULAR / João Victor Narducci Ferreira. -- Diadema, 2021.  
66 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química  
Industrial) - Universidade Federal de São Paulo - Campus  
Diadema, 2021.

Orientador: Luciano Caseli

1. Filmes de Langmuir. 2. Modelos de membrana celular. 3. Timol.  
4. Simulação molecular. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas,  
Campus Diadema da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais  
Pedro Guilherme e Delina Narducci

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais Pedro Guilherme Ferreira e Delina de F. L. Narducci Ferreira por serem meus professores da vida. Por me ensinarem muito mais que física e educação básica, respectivamente, mas por me ajudarem a criar caráter, personalidade e moral para formar a pessoa quem sou hoje. Por nunca medirem esforços para me dar a melhor criação e educação possível e por tirar do de vocês para colocar no meu. Vocês sempre foram e sempre serão minhas inspirações e minha referência pra tudo. Saibam que eu tenho muito orgulho de ser filho de vocês. Isso tudo aqui sempre foi por vocês!

Agradeço ao meu professor e orientador Dr. Luciano Caseli que acreditou no meu potencial e no meu trabalho desde o início. Por ter me proporcionado tantas experiências incríveis (minha primeira viagem de avião), tantos ensinamentos e aprendizados durante todos esses anos. Seja dentro da classe de físico-química, seja no laboratório, professor, saiba que o Sr. sempre foi e será um exemplo pra mim e é sempre um orgulho fazer parte do seu time. Obrigado por ser a pessoa que tornou possível tudo acontecer.

Agradeço a minha namorada Fernanda por estar ao meu lado sempre, me apoiando nos momentos difíceis e comemorando as conquistas comigo. Por nunca desistir de me incentivar e me ajudar sempre que precisei. E aos meus amigos que nessa trajetória estiveram juntos comigo sempre. Vocês foram essenciais pra que tudo acontecesse e eu espero levar vocês pra toda vida: Igor, Gabriel, Danilo, Mônica, Sarah, Victória, Leonardo e todos os outros que diretamente ou indiretamente me ajudaram a chegar neste momento.

À Universidade Federal de São Paulo que me proporcionou a realização de um sonho e os ensinamentos que tive aqui tanto dentro quanto fora de classe eu levarei para toda minha vida.

Ao laboratório de materiais híbridos por proporcionar toda a estrutura, ao ex-professor Dr. João Lago por fornecer o fármaco estudado nesse projeto e ao professor Dr. Leonardo Siqueira pelo suporte com simulação molecular. E finalmente, a CNPq pelo auxílio financeiro para a realização do projeto durante a Iniciação Científica.

## RESUMO

A compreensão sobre a interação entre membranas celulares e substâncias com possível ação microbica é farmacologicamente importante uma vez que podemos acessar informações de interações no nível molecular. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar a interação do 2-isopropil-5-metilfenol (timol), uma substância com possível ação bactericida e antifúngica, com modelos de membrana celular formados a partir de monocamadas de Langmuir constituídas por lipídios. Com o objetivo de analisar a influência da natureza química do lipídio, incluindo suas cargas, foram empregados lipídios com carga positiva, brometo de octadecildimetilamônio (DODAB), com carga negativa, dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), e zwitteriônicos, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), e o timol foi incorporado à monocamada lipídica. O timol, quando espalhado sozinho na interface ar-água, não apresentou atividade superficial, porém, na presença de lipídios, altera as propriedades físico-químicas das monocamadas, provocando um deslocamento para áreas maiores nas isotermas pressão superficial-área e consequentemente expandindo a monocamada. A espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) foi empregada para analisar as bandas vibracionais características. Além disso, a Microscopia pelo Ângulo de Brewster (BAM) mostrou que nenhum dos lipídios puros formam agregados na interface ar-água, porém, com o timol incorporado à monocamada, verificam-se domínios na interface ar-água com diferentes refletividades, conforme observado nas imagens obtidas por BAM. Simulação de Dinâmica Molecular foi empregada a fim de prever a localização preferencial da droga nos modelos de membrana celular. O potencial calculado de força média (PMF) sugere que o timol é preferencialmente encontrado nas regiões próximas à interface cadeia lipídica/ar. Como conclusão, pode-se inferir que o timol é adsorvido preferencialmente em lipídios de carga positiva, considerando que foi observada uma maior expansão relativa da monocamada formada com esses lipídios, assim como alterações mais pronunciadas nos espectros de PM-IRRAS.

**Palavras Chave:** Langmuir, Timol, Modelos de Membrana celular.

## ABSTRACT

Understanding the interaction between cell membranes and substances with possible microbicidal action is pharmacologically essential since we can access information on interactions at the molecular level. In this context, this work aimed to investigate the interaction of 2-isopropyl-5-methyl phenol (thymol), a substance with possible bactericidal and antifungal action, with cell membrane models formed from Langmuir monolayers composed of lipids. To analyze the influence of the chemical nature of the lipid, including its charges, positively charged lipids, octadecyldimethylammonium bromide (DODAB), negatively charged ones, dipalmitoyl phosphatidylserine (DPPS), and zwitterionic ones, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) were employed, and thymol was incorporated into the lipid monolayer. Thymol, when spread alone at the air-water interface, did not show surface activity. However, in the presence of lipids, it changes the monolayers' physical-chemical properties, causing a shift to larger areas in the surface pressure-area isotherms and, consequently, expanding the monolayer. Polarization modulation infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS) was used to analyze the characteristic vibrational bands. Besides, Brewster's Angle Microscopy (BAM) showed that none of the pure lipids form aggregates at the air-water interface. However, with the thymol incorporated into the monolayer, domains are observed at the air-water interface with different reflectivities. Molecular Dynamics Simulation was employed to predict the preferred location of the drug in cell membrane models. The calculated mean force potential (PMF) suggests that thymol is preferentially found in regions close to the lipid chain/air interface. In conclusion, it can be inferred that thymol is preferentially adsorbed on positively charged lipids, considering that a more significant relative expansion of the monolayer formed with these lipids was observed, as well as more pronounced changes in the PM-IRRAS spectra.

**Keywords:** Langmuir, Thymol, Cell Membrane Models.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 Membrana celular: composição, estrutura e funções .....	1
1.2 Moléculas anfifílicas .....	2
1.3 Fosfolipídios.....	3
2. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB).....	5
2.1 Retrospecto histórico.....	7
2.2 Aplicação como modelos de membrana .....	8
2.3 Técnicas de caracterização.....	9
2.3.1 Isotermas de pressão <i>versus</i> área ( $\pi$ -A).....	10
2.3.2 PM-IRRAS .....	12
2.3.3 Microscopia no Ângulo de Brewster - BAM.....	14
2.3.4 Dinâmica Molecular.....	16
2. Fitoterápicos .....	17
2.1 O Timol.....	19
2.2 Sua atividade bactericida .....	20
2.3 A atividade antifúngica.....	22
3.0 Objetivos .....	24
4.0 Procedimentos Experimentais .....	25
4.1 Instrumentação .....	25
4.2 Reagentes e soluções.....	25
4.3 Caracterização para os filmes de Langmuir .....	27
4.3.1 Caracterização por Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) .....	27
4.3.2 Caracterização por PM-IRRAS .....	28
4.3.3 Caracterização por Microscopia no Ângulo de Brewster (BAM).....	29
4.3.4 Caracterização por dinâmica molecular.....	29
5.0 Resultados e Discussões .....	30
5.1 Isotermas de Pressão .....	30
5.1.1 Timol.....	30
5.1.2 DPPC e Timol .....	31
5.1.3 DPPS e Timol.....	33
5.1.4 DODAB e Timol .....	33
5.2 PM-IRRAS .....	34



5.2.1	DPPC e Timol .....	34
5.2.2	DPPS e Timol.....	36
5.2.3	DODAB e Timol .....	38
5.3	Microscopia no Ângulo de Brewster (BAM).....	40
5.3.1	DPPC e Timol .....	40
5.3.2	DPPS e Timol.....	40
5.3.3	DODAB e Timol .....	41
5.4	Dinâmica molecular .....	42
6.0	Conclusões .....	47
7.0	Referências Bibliográficas .....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático de uma membrana plasmática, composta por uma matriz de bicamada lipídica.....	1
Figura 2. Distinção entre regiões de uma molécula anfifílica. ....	3
Figura 3. Estrutura molecular do fosfolipídio DPPC. ....	5
Figura 4. Esquema representando compressão de monacamadas de Langmuir e formação de filme Langmuir-Blodgett. Bem como suas possíveis estruturas para as deposições do tipo Y, X e Z. ....	7
Figura 5. Representação da cuba de Langmuir utilizada na construção de monacamadas lipídicas. ....	8
Figura 6. Exemplo da aplicação de filmes de Langmuir na mimetização de biointerfaces. A orientação de materiais anfifílicos sobre a interface ar/água pode formar estruturas similares à metade de uma membrana celular, na qual a subfase aquosa representa a região .....	9
Figura 7. Esquema de uma isoterma $\pi$ -A geral. A forma geral dessas isotermas depende da temperatura da subfase e do comprimento da cadeia de hidrocarbonetos. As diversas fases dos filmes são observadas. ....	12
Figura 8. Representação das polarizações s e p e o ângulo de incidência ( $\theta_i$ ) em relação à superfície. ....	14
Figura 9. Representação de um feixe de luz incidindo com ângulo em duas situações. Na primeira parte da representação, a luz incide sob uma superfície limpa contendo apenas água, sendo observado apenas o fenômeno de refração. Na segunda possível situação, o ângulo incidente é refratado, e também, refletido por conta da presença do filme na interface ar-água. Os índices $n_1$ e $n_2$ representam os índices de refração do ar e da água respectivamente.....	15
Figura 10. Estrutura molecular (a) timol e (b) carvacrol .....	19
Figura 11. Esquema representando o pass-a-passo para caracterização de monacamadas na cuba de Langmuir.....	27
Figura 12. Representação computacional da monocamada lipídica obtida através do programa PACKMOL .....	30
Figura 13. Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) da droga timol pura espalhada em água .....	31
Figura 14. Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) do fosfolipídio DPPC puro espalhado em água e também do mesmo com timol nas quantidades 10, 20 e 30 $\mu$ L. ....	32
Figura 15. Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) do fosfolipídio DPPS puro espalhado em água e também do mesmo com timol nas quantidades 10, 20 e 30 $\mu$ L. ....	33
Figura 16. Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) do fosfolipídio DODAB puro espalhado em água e também do mesmo com timol 30 $\mu$ L. ....	34
Figura 17. Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPC e da droga timol entre 1000 – 1800 $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 10, 20 e 30 $\text{mN.m}^{-1}$ . ....	35
Figura 18. Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPC e da droga timol entre 2800 – 3000 $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 10, 20 e 30 $\text{mN.m}^{-1}$ . ....	36
Figura 19. Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPS e da droga timol entre 1000 – 1800 $\text{cm}^{-1}$ , na pressão de 30 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	37
Figura 20. Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPS e da droga timol entre 2800 – 3000 $\text{cm}^{-1}$ , na pressão de 30 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	38

Figura 21. Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DODAB e da droga timol 1000 – 1800 $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 15 e 30 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	39
Figura 22. Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DODAB e da droga timol entre 2800 – 3000 $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 15 e 30 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	39
Figura 23. Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do filme de DPPC puro e na presença da droga timol, obtidas na pressão de 30 $\text{mN.m}^{-1}$ (Resolução de 3600 x 4000 $\mu\text{m}$ ) .....	40
Figura 24. Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do filme de DPPS puro e na presença da droga timol, obtidas na pressão de 30 $\text{mN.m}^{-1}$ (Resolução de 3600 x 4000 $\mu\text{m}$ ) .....	41
Figura 25. Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do filme de DODAB puro e na presença da droga timol, obtidas na pressão de 30 $\text{mN.m}^{-1}$ (Resolução de 3600 x 4000 $\mu\text{m}$ ) .....	41
Figura 26. Potencial da força média calculada para o timol através das interfaces de vácuo-DPPC e DPPC-água a 300 K, representada no painel superior. A densidade de massa de DPPC e água foi calculada em 300 K (painel inferior).....	43
Figura 27. Quantidade de moléculas de timol por área molecular de DPPC ao puxar o filme em direção a monocamada (painel superior) e densidade de massa de DPPC e água calculado em 300 K (painel inferior).....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura dos lipídios utilizados na construção dos diferentes filmes de Langmuir. 26

## LISTA DE ABREVIATURAS

BAM – Brewster Angle microscopy (microscopia no ângulo de Brewster)

DPPC – Dipalmitoil fosfatidil colina

DPPS – Dipalmitoil fosfatidil serina

DPPG - Dipalmitoil fosfatidil glicerol

DODAB - Brometo de dioctadecildimetilamônio

LB – Langmuir- Blodgett

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

PM-IRRAS - Polarization modulation-infrared reflection-adsorption  
spectroscopy

## 1. Introdução

### 1.1 Membrana celular: composição, estrutura e funções

As células são unidades elementares dos seres vivos e podem ser categorizadas como: células procariotas, sem a presença de membrana interna (característica de seres unicelulares como bactérias e cianófitas), e células eucariotas que possuem membrana interna delimitando núcleo e organelas como retículo endoplasmático, mitocôndria e outras (típica de seres pluricelulares como os seres humanos) (1).

A membrana celular, também conhecida como membrana plasmática, delimita o perímetro interno-externo das células, ou seja, separando o meio intracelular do extracelular. Constituída por uma bicamada fluída de 7-10 nm, sua semipermeabilidade, ou barreira seletiva, possibilita a comunicação entre os compartimentos para que estes consigam realizar trocas entre o interior e o exterior (2) (4).

**Figura 1.** Desenho esquemático de uma membrana plasmática, composta por uma matriz de bicamada lipídica.

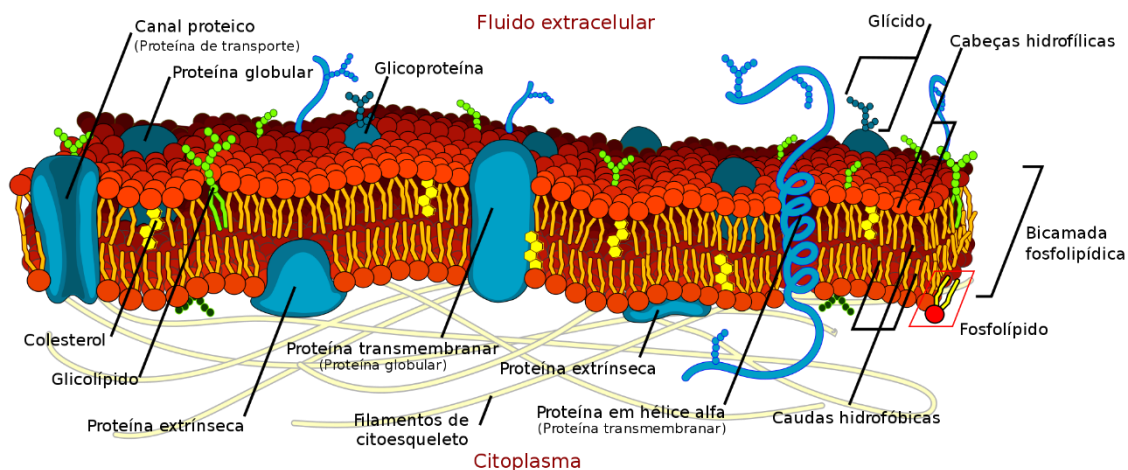


Figura retirada do website [https://pt.wikipedia.org/wiki/Membrana\\_plasm%C3%A1tica](https://pt.wikipedia.org/wiki/Membrana_plasm%C3%A1tica)

Esta bicamada fluída é composta por diversas moléculas anfifílicas como lipídios, proteínas e alguns polissacarídeos. Dentre suas funções essenciais estão a compartimentalização da célula, a regulação do transporte de nutrientes para dentro da célula, assim como o de resíduos para fora da célula, e controlar a resposta das células ao ambiente externo (sinalização por proteínas transmembranas). Além disso, a fluidez e flexibilidade da membrana possibilitam é

fundamental para processos como gametogênese, divisão celular e síntese proteica (2) (3).

O glicocálice aparece em alguns tipos de células animais, associado à membrana celular, realizando o papel de cobertura externa da membrana (composto por oligômeros e proteínas). Já o citoesqueleto é uma formação comum do lado interno da membrana composto de proteínas como a actina e contribuem para funções celulares complexas.

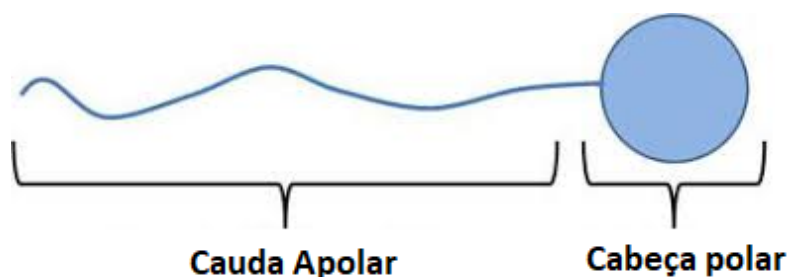
Os principais componentes da membrana celular são os lipídios. Eles podem ser divididos em classes como ácidos graxos, sabões, esteróis, fosfolipídios, esfingolipídios, glicolipídios entre outros. Em células animais, o tipo de lipídio mais abundante é o fosfolipídio, seguido dos esfingolipídios e esteróis.

Outro elemento importante na composição das membranas celulares são as proteínas, para cada tipo de proteína existe a predominância de alguns aminoácidos na estrutura. Elas são responsáveis por algumas funções da membrana celular como sinalização celular e fenômenos de adesão (4).

## **1.2 Moléculas anfifílicas**

Moléculas anfifílicas ou anfipáticas, são caracterizadas por apresentar uma região hidrofóbica (apolar) e uma região hidrofílica (polar). A região hidrofóbica comumente é composta por longas cadeias desprovidas de carga, que podem interagir entre si formando estruturas supramoleculares que se interagem por meio de forças de van de Waals. Esta “cauda hidrofóbica” é caracterizada por possuir um grupo polar em sua extremidade, comumente chamado de “cabeça hidrofílica”, podendo ser eletricamente neutra ou carregada. A figura 2 representa uma molécula anfifílica assim como a diferenciação entre as regiões. A cauda destituída de polaridade elétrica é pouco solúvel em água, enquanto a cabeça polar carrega polaridade elétrica o qual se demonstra afinidade com solventes polares, como a água (5).

**Figura 2.** Distinção entre regiões de uma molécula anfifílica.



Adaptada de

[https://www.teachengineering.org/view\\_lesson.php?url=collection/uf/\\_/lessons/uf\\_surfactants\\_les1/uf\\_surfactants\\_les1.xml](https://www.teachengineering.org/view_lesson.php?url=collection/uf/_/lessons/uf_surfactants_les1/uf_surfactants_les1.xml)

Aplicando estes conceitos para caracterizar compostos biológicos, encontramos diversos composto anfifílicos, como os fosfolipídios, colesterol, glicolipídios, ácidos graxos, entre outros. Como citado anteriormente, os fosfolipídios são encontrados majoritariamente na estruturação das membranas celulares e seu papel morfológico é fundamentalmente como alicerce da bicamada celular.

### 1.3 Fosfolipídios

A estrutura molecular de fosfolipídios consiste de duas caudas formadas por ácidos graxos com caráter hidrofóbico, ligadas por meio de um glicerol a uma cabeça polar hidrofílica composta de um grupo fosfato. Este fosfato é ligado por esterificação do grupo OH localizado na posição 1 do glicerol e pode se ligar a outro grupo R na outra ponta da molécula o qual vai formar a região hidrofílica da molécula (6).

Esta característica anfifílica é fundamental para estabelecer uma interface entre o meio intracelular e o extracelular que permite a compartimentalização. A forma como as moléculas fosfolipídicas se inserem umas nas outras, tem origem no comprimento e na saturação das caudas dos ácidos graxos, influenciando diretamente em sua fluidez. Esta organização remete à permeabilidade seletiva da membrana, e a difusão simples favorece apenas o trânsito de moléculas lipossolúveis e de água, apesar de sua característica polar.

Os fosfoglicerídios são os principais fosfolipídios constituintes da maioria das membranas celulares animais. Eles dispõem de uma cadeia principal de glicerol de



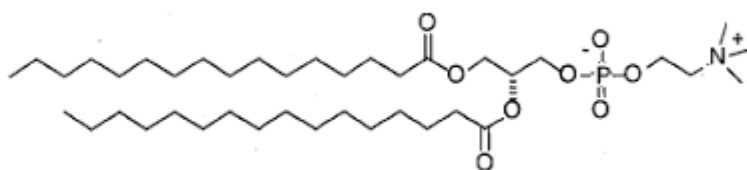
três carbonos. As cadeias de ácidos graxos são unidas ao átomo adjacente de carbono do glicerol através de pontes ésteres, enquanto isso o terceiro átomo de carbono do glicerol está associado ao grupo fosfato, que por sua vez, se une a um dos diversos tipos de grupamentos de cabeças (7).

As fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilcolinas, colesterol e esfingolipídeos são os lipídios mais relevantes das membranas celulares de mamíferos. Junto eles compõem mais da metade da massa de lipídios.

Peculiarmente, lipídios que possuem o grupo colina na região hidrofílica são altamente presentes em diversas membranas celulares. Devido a isso, eles são normalmente usados em modelos de membrana e dentre este específico nicho de fosfolipídios com o grupo colina na parte hidrofílica, destaca-se o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), Figura 3, utilizado nesse trabalho de conclusão de curso. (7) Este fosfolipídio foi escolhido como lipídio base em simulações de membranas celulares em modelos de membrana, já que a fosfatidicolina é predominantemente encontrada em membrana celular animal. Além deste, também foram utilizados os seguintes fosfolipídios dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) e Brometo de dioctadecildimetilamonio (DODAB) (8).

Utilizou-se somente lipídios com cadeias saturadas, pela facilidade de caracterização, e a possibilidade de controlar a fluidez de monocamadas desses lipídios, indo da fase fluida para a fase condensada, por compressão. Membranas celulares são naturalmente fluidas com domínios condensados denominados “jangadas moleculares”. Além disso, destacamos que lipídios com carga positiva, tal como o DODAB, não são encontrados em membranas celulares, e o utilizamos para contrastar o efeito do timol em lipídios de carga positiva e negativa.

**Figura 3.** Estrutura molecular do fosfolipídio DPPC.



Fonte: <https://avantilipids.com/product/850355/>

## 2. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

Devido as suas características anfifílicas, os fosfolipídios ao serem espalhados sobre uma subfase, se reorganizam de forma que sua cauda apolar se direciona a interface apolar (ar) e sua cabeça polar volta-se para a interface polar (água). Vale ressaltar que é interessante que este fosfolipídio esteja dissolvido em um solvente altamente volátil e de baixa constante dielétrica (9).

Quando espalhados, formam-se uma monocamada organizada na interface ar-água, denominada filme ou monocamada de Langmuir. Para uma maior estabilização da monocamada, é interessante que sua parte hidrofóbica tenha por constituição uma cauda de doze carbonos ou mais. Isso garante uma considerável organização estrutural, baixa solubilidade à subfase aquosa e uma maior capacidade de espalhamento homogêneo do filme. Isso deve ocorrer porque as forças adesivas (da cabeça hidrofílica com subfase aquosa) são maiores que as forças coesivas do fosfolipídio (10).

O recipiente utilizado para a obtenção da monocamada chama-se cuba de Langmuir. Feita usualmente de um material inerte, o Teflon® (poli(tetrafluroetileno)) que contém a subfase aquosa. A cuba de Langmuir pode possuir barreiras móveis que têm o objetivo de comprimir o filme formado, afetando diretamente nas interações entre as moléculas anfifílicas.

Ao espalhar a solução orgânica sobre a interface ar-água, a área média ocupada por molécula anfifílica insolúvel na interface (normalmente na escala de Å<sup>2</sup>) é usualmente alta o suficiente para não produzir alteração significativa na tensão

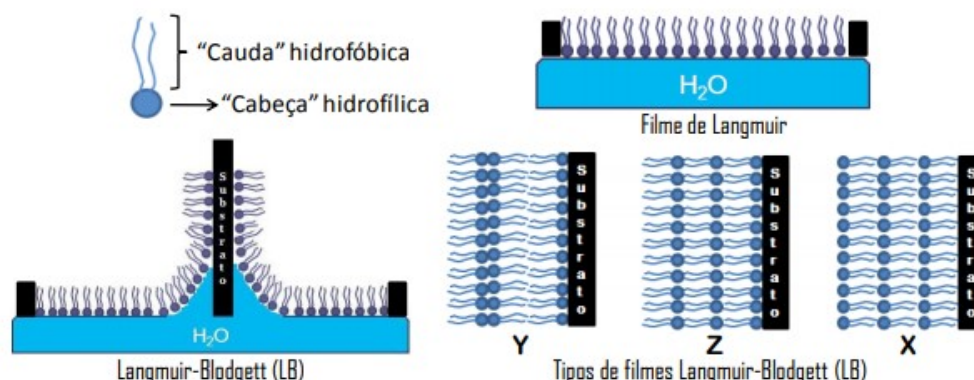
superficial água. Isso se faz controlando a quantidade de material espalhado, que deve ser suficientemente pequena, ou seja, as interações laterais entre as moléculas anfifílicas são fracas ou negligenciáveis e o filme se encontra num estado bidimensional intitulado “gasoso”. Após iniciar-se a compressão do filme pelas barreiras, a área por molécula diminui e, portanto, as interações laterais das moléculas anfifílicas aumentam, reduzindo a tensão superficial. Dessa maneira, por compressão, atingem-se estados interfaciais mais condensados, como líquido-expandido, líquido-condensado e sólido.

Já filmes de Langmuir-Blodgett (LB) derivam de filmes de Langmuir (dito “flutuantes”) que são transferidos para suportes sólidos que interceptam verticalmente a interface ar/água (dito “suportados”). Tal transferência permite a formação de dispositivos sólidos com um alto nível de organização e espessura definida. Uma vez que cada passagem do suporte sólido pela interface pode originar na transferência de uma monocamada, o número de monocamadas depositadas, e consequentemente a espessura do filme, é controlado pelo número de imersões e emersões do suporte sólido. O controle da transferência é aferido pela razão de transferência, que é calculada pela razão entre a área diminuída da monocamada flutuante para manter a pressão superficial constante durante o processo e a área do suporte sólido.

Além disso, fatores como pH da subfase aquosa, conteúdo iônico do meio, velocidade de imersão e retirada, hidrofilicidade e hidrofobicidade do suporte sólido, natureza química do anfifílico, tempo de secagem do suporte sólido após emersão e temperatura podem ditar a forma de deposição da monocamada no substrato. A escolha do substrato deve acontecer mediante uso posterior a ser empregado ao filme LB. Por exemplo, silício é utilizado para difração de raios-x, mica para análises de microscopia de força atômica, e superfícies metálicas para pesquisas espectroscópicas no infravermelho. As deposições no filme LB podem dar origem a três tipos de filmes: X, Y e Z (11).

A figura 4, mostra estruturas idealizadas de Langmuir e LB e suas deposições:

**Figura 4.** Esquema representando compressão de monacamadas de Langmuir e formação de filme Langmuir-Blodgett. Bem como suas possíveis estruturas para as deposições do tipo Y, X e Z.



## 2.1 Retrospecto histórico

Monocamadas moleculares espalhadas sobre uma subfase aquosa vêm sendo estudadas desde o século XVII com Benjamin Franklin, que realizou experimentos relativos a uma película de óleo na superfície da água (12). Os registros deixados por Franklin serviram de base para que Rayleigh realizasse o cálculo aproximado da espessura desse filme molecular nanoestruturado, chegando a um valor de 20 Å. Além de estimar a espessura do filme orgânico, a experiência foi capaz de provar a teoria de Avogadro e o número de partículas constituídas em um mol de matéria.

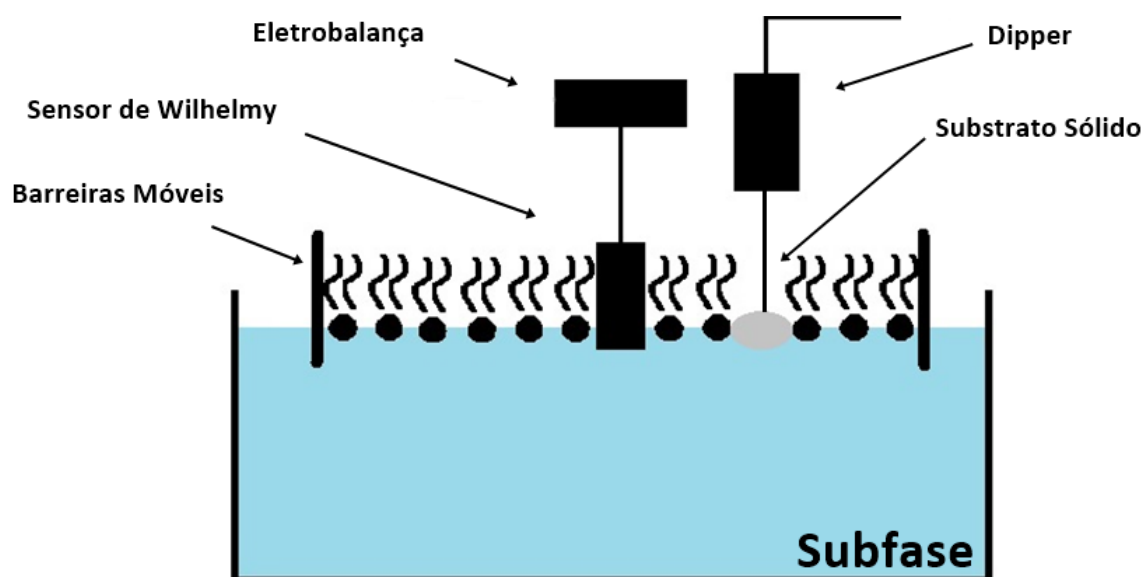
Também na virada dos séculos XVII e XIX, Agnes Pockels (13) possuía grande curiosidade em entender o comportamento que óleos e sabões apresentavam sobre a tensão superficial da água. Isso levou ela a prototipar a primeira cuba com foco na medição de tensão superficial como uma função da concentração de impurezas. Aquilo que mais tarde se desenvolveria nas curvas de pressão de superfície versus área. Agnes também foi pioneira na utilização de solventes voláteis para serem espalhados na interface ar/água, além de calcular as diferentes concentrações necessárias para formação de filmes estruturados (12).

Por volta de 1917, o cenário relacionado aos conhecimentos sobre filmes nanoestruturados muda de forma com a chegada do renomado cientista americano Irving Langmuir. Langmuir foi o primeiro pesquisador a observar a elevada estabilidade dos filmes monoatômicos adsorvidos em filamentos de tungstênio e platina. Após inúmeras experiências de filmes feitos de óleo sobre a água,

desenvolveu uma teoria geral dos filmes adsorvidos, incluindo pesquisas de suas propriedades catalíticas.

Devido a este trabalho pioneiro, Langmuir levou seu nome as monocamadas formadas, denominando-as “monocamadas de Langmuir”. Como uma segunda parte desta história, Langmuir tinha uma colaboradora chamada Katherine Blodgett. Juntos eles desenvolveram os estudos de filmes transportados para suportes. Devido a gigantesca contribuição aos estudos de filmes nanoestruturados, essa área é conhecida como tecnologia de Langmuir-Blodgett (10).

**Figura 5.** Representação da cuba de Langmuir utilizada na construção de monocamadas lipídicas.



## 2.2 Aplicação como modelos de membrana

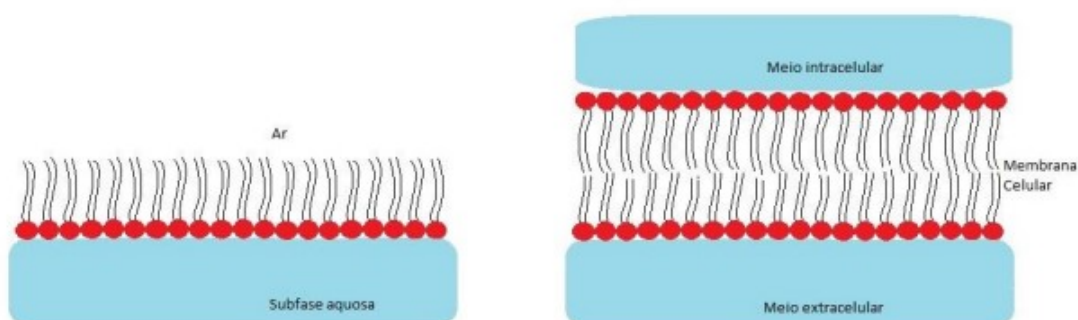
Para entender a forma que moléculas externas interagem com tecidos, como a difusão do material do meio extracelular para o intracelular, mudanças no formato das células, aglutinação, entre outros, é comum utilizar cultura de células para avaliar tais efeitos. Todavia, as pesquisas sobre técnicas experimentais para caracterização química estrutural e investigação de interações no nível molecular não estão avançadas neste ponto. Portanto, pesquisadores de diversas áreas têm recorrido aos modelos de membrana, especialmente aos modelos de membrana celular, com a

finalidade de aumentar a compreensão dessas interações moleculares que ocorrem nesta importante interface biológica (14).

Em 1925, Gorter e Grendel desenvolveram o primeiro modelo experimental de membrana usando lipídios extraídos da membrana de eritrócitos e uma cuba de Langmuir para desenvolver um modelo de bicamada lipídica. Vale ressaltar que a membrana celular possui uma complexidade elevadíssima para que se possa reproduzi-la virtualmente, mesmo empregando os sistemas mais avançados. Desta maneira, a técnica de Langmuir, uma forma simplificada para o estudo das interações específicas entre certas substâncias com determinada atividade biológica e diferentes tipos de lipídios e proteínas (15).

A técnica LB demonstra enorme vantagem no quesito mimetização de interfaces biológicas devido ao grande controle sobre seu empacotamento e a composição do filme molecular, além da viabilização de técnicas de caracterização *in situ*, que possibilitam o acompanhamento imediato do sistema. Assim, como mostrado na figura 6, apesar de representarem apenas metade de uma bicamada lipídica, ainda é uma ótima técnica para simular a primeira barreira encontrada por uma molécula externa a uma membrana celular.

**Figura 6.** Exemplo da aplicação de filmes de Langmuir na mimetização de biointerfaces. A orientação de materiais anfífilos sobre a interface ar/água pode formar estruturas similares à metade de uma membrana celular, na qual a subfase aquosa representa a região



## 2.3 Técnicas de caracterização

Para a caracterização de filmes de Langmuir, existe uma vasta gama de técnicas que podem ser empregadas no estudo da interação de substâncias

adicionadas a monocamada lipídica. Neste capítulo, serão detalhadas técnicas como isotermas de pressão de superfície versus área por molécula (isotermas  $\pi$ -A), microscopia no ângulo de Brewster (BAM) e espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com modulação de luz polarizada (PM-IRRAS), utilizadas nesse trabalho.

### 2.3.1 Isotermas de pressão versus área ( $\pi$ -A)

A pressão superficial ( $\pi$ ) é medida através de um sensor pelo método de Wilhelmy e varia de acordo com a presença ou ausência de contaminantes, e pela temperatura controlada.

Ao se dispersar os fosfolípidios anfifílicos sobre a interface ar-água, promove-se um equilíbrio de forças entre moléculas superficiais da subfase aquosa e da interface. Isso provoca uma variação na tensão superficial da subfase aquosa. Desta maneira, se estabelece matematicamente o conceito de pressão superficial, calculado pela tensão da água sem a monocamada ( $\gamma_o$ ) subtraído pela da tensão superficial da água com a monocamada formada ( $\gamma_m$ ), conforme equação 1:

$$\pi = \gamma_o - \gamma_m \quad (1)$$

Após o espalhamento das moléculas anfifílicas na superfície e a formação do filme, a tensão superficial tende a diminuir, e, portanto, a pressão de superfície aumenta. À medida que as barreiras da cuba de Langmuir vão se movimentando no sentido da redução de área (A) compreendida entre elas, é possível observar a variação da pressão de superfície, obtendo-se, então, as chamadas isotermas  $\pi$ -A (16).

Ao analisar uma isoterma  $\pi$ -A, é possível inferir a respeito da reorientação das moléculas no sistema bidimensional, sobre a existência de fases de transição (gasoso, líquido-expandido, líquido-condensado e sólido), transformações conformacionais e a estabilidade da monocamada na interface ar-água.

A área molecular mínima ocupada por uma molécula na interface é definida como a área limite da dispersão molecular em um filme de Langmuir e é obtida traçando-se uma reta tangente à região correspondente à fase mais condensada e

extrapolando para pressões nulas. Assim, na intersecção da extrapolação de tal linha reta com o eixo das abscissas, obtemos a área molecular mínima (16).

Conforme as barreiras vão se fechando e comprimindo lateralmente o filme, diferentes fases da monocamada lipídica vão sendo evidenciadas e essas determinam o arranjo e a organização molecular.

Os nomes dados a essas fases referentes às diferentes formas de acomodação ou empacotamento das moléculas na interface recebem estes nomes por analogia aos estados de empacotamento da matéria em três dimensões. As fases observadas no gráfico são:

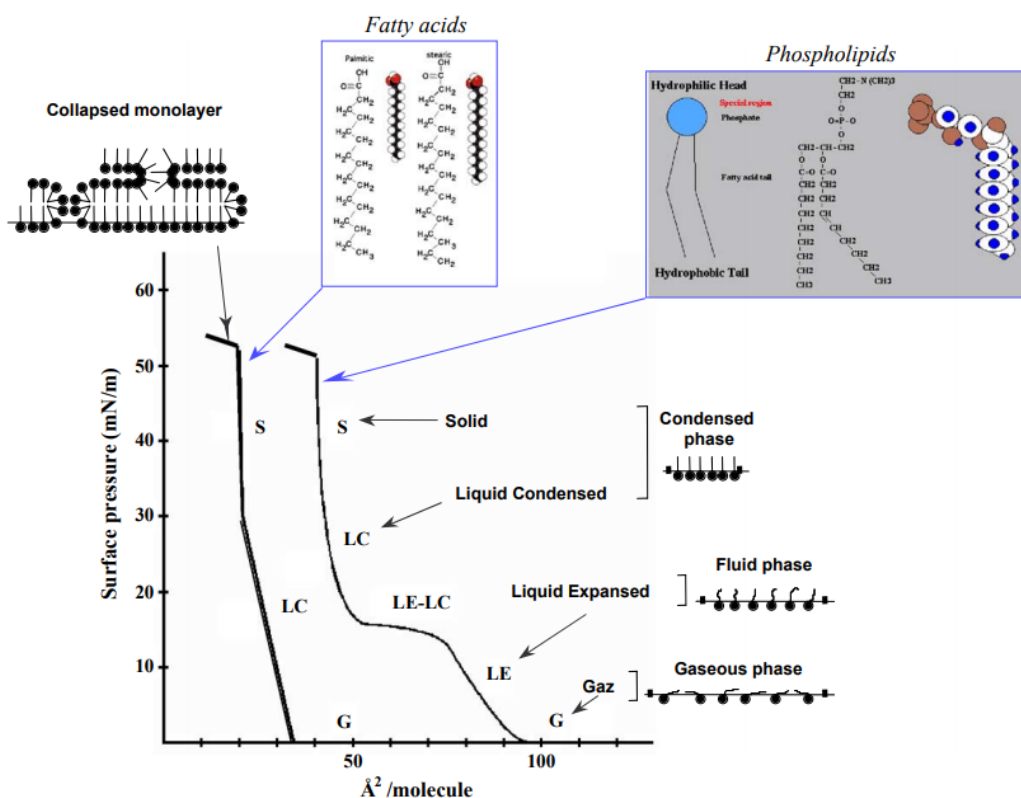
- i) Gasosa (G): nesta fase, a pressão da interface é baixa, uma vez que as moléculas estão distantes uma das outras, quase não possuindo atrações entre elas;
- ii) Líquido Expandido (LE): com a diminuição da área através das barreiras móveis, a pressão tende a aumentar. As moléculas começam a se aproximar uma das outras, e ao interagir progressivamente, o filme tende a começar a organizar-se
- iii) Líquido Condensado (LC): à medida que a área diminui, o filme tende a se organizar cada vez mais. Dependendo da substância a se analisar e da temperatura, mais fases condensadas podem ser observadas.
- iv) Sólida (S): esta fase indica o grau máximo de compressão do filme. As moléculas estão totalmente organizadas, com as caudas hidrofóbicas orientadas de forma perpendicular à superfície. Caso haja um excedente de força de compressão, a monocamada entrará em “colapso”.
- v) Colapso: quando o sistema sofre uma compressão acima do limite tolerado das moléculas e elas perdem sua arquitetura monomolecular. Assim, as moléculas perdem sua estrutura ordenada e o filme forma estruturas tridimensionais. Neste momento, pode haver sobreposição de camadas em direção ao ar, ou formação de micelas ou vesículas em direção à fase aquosa.

Ao ser comprimida e descomprimida simultaneamente em curtos períodos de tempo, a monocamada pode sofrer alterações em sua estrutura por estar fora de seu



equilíbrio termodinâmico. Para entender esse comportamento do filme, utiliza-se a análise de histerese através de ciclos de compressão e descompressão contínuos. Assim, obtém-se informações sobre a reversibilidade do filme e possíveis efeitos de acomodação molecular.

**Figura 7.** Esquema de uma isoterma  $\pi$ -A geral. A forma geral dessas isotermas depende da temperatura da subfase e do comprimento da cadeia de hidrocarbonetos. As diversas fases dos filmes são observadas.



Adaptado de Fonte: Girard-Egrot, A. P.; Godoy, S.; Blum, L. J.; Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: Interests and applications in nanoscience. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2005, 166, (1-3), 205-225.

### 2.3.2 PM-IRRAS

A partir do grande valor em entender os modos vibracionais de moléculas anfifílicas constituintes de um filme ultrafino, as análises espectroscópicas na região do infravermelho nos ajudam entender a estruturação do sistema em nível molecular. Além disso, a comparação de espectros das substâncias aderidas à interface ar/água se torna útil para a caracterização de interações que ocorrem com a monocamada fosfolipídica. A maior dificuldade encontrada é extrair o fraco sinal que a monocamada gera, diferenciá-lo da absorção de luz da fase líquida, do vapor de água, do gás carbônico e metano atmosférico. Devido a esses impeditivos, técnicas mais usuais

como o FTIR (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier) se tornam inviáveis, tornando necessário o modo de reflexão.

Técnica desenvolvida por Greenler nos anos 60, o IRRAS (espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho) é um método espectroscópico na região do infravermelho baseada na reflexão de luz incidente. Essa técnica de análise possui extrema sensibilidade à orientação das moléculas suportadas em substratos sólidos altamente reflexivos (17).

Com o passar dos anos, tal técnica foi sendo aprimorada no ramo de filmes ultrafinos, a fim de possibilitar a obtenção de informações sobre os modos vibracionais das moléculas anfifílicas espalhadas na interface ar/água.

Já o PM-IRRAS (espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho com modulação da luz polarizada) é considerada a técnica com maior aplicabilidade dentro da tecnologia de filmes ultrafinos de Langmuir. Nesta técnica, o feixe de onda eletromagnética que incide na superfície é polarizado, e a detecção é modulada em seus componentes “p” (perpendicular ao plano de incidência) e “s” (paralelo ao plano de incidência) (18).

O sinal do PM-IRRAS, representado por “S”, é a diferença entre  $R_p$  e  $R_s$  que são, respectivamente, as refletividades para as polarizações “s” e “p” dividido pela sua soma, como mostra na equação 2.

$$S = (R_p - R_s) / (R_p + R_s) \quad (2)$$

Além disso, devido ao feixe “s” ser mais sensível a dipolos horizontalmente orientados e feixes p-polarizados serem mais sensível a dipolos vibracionais verticalmente orientados, a distinção da orientação relativa dos diferentes grupos constituintes do filme torna-se possível (18).

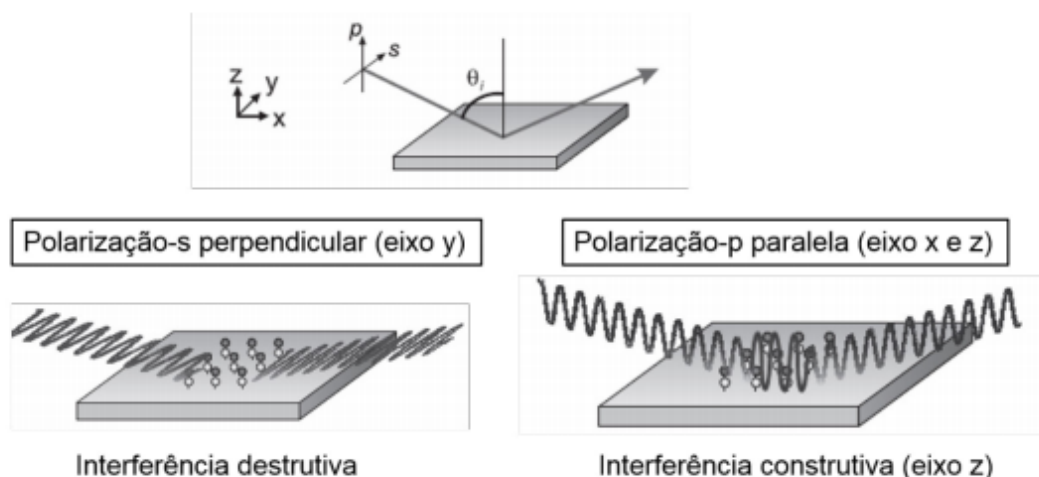
Como resultado, tem-se bandas que podem ser negativas ou positivas, sendo elas, negativas em referência à linha base mostram orientações do dipolo vibracional perpendiculares à interface, e bandas positivas que mostram orientações do dipolo vibracional paralelas à interface. Se houverem quaisquer dipolos que se comportam de forma aleatória na superfície, irão gerar bandas que se anulam, o que favorece a

contribuição de moléculas que estão no caminho ótico (como por exemplo, CO<sub>2</sub> e vapor de água) seja minimizada, reduzindo assim possíveis fontes de ruído (19).

Além disso, a subtração do espectro de referência da superfície, sem tensoativo, produz o sinal  $\Delta S$  ( $S_{\text{filme+água}} - S_{\text{água}}$ ), que permite distinguir efeitos de absorção por moléculas de água superficiais orientadas daqueles gerados pelo filme monomolecular. Por fim, um detector acoplado à cuba amplifica o fraco sinal refletido pela amostra, gerando um espectro vibracional ( $S$  versus número de onda; ou  $\Delta S$  versus número de onda) onde o sinal de PM-IRRAS é um valor de absorção da reflexão em relação à luz incidida.

Segue um esquema do princípio de funcionamento da técnica:

**Figura 8.** Representação das polarizações s e p e o ângulo de incidência ( $\theta_i$ ) em relação à superfície.



Adaptado de Urakawa, A., Bürgi, T. & Baiker, A. Modulation Excitation PM-IRRAS: A New Possibility for Simultaneous Monitoring of Surface and Gas Species and Surface Properties. *Chim. Int. J. Chem.* 60, 231–233 (2006)

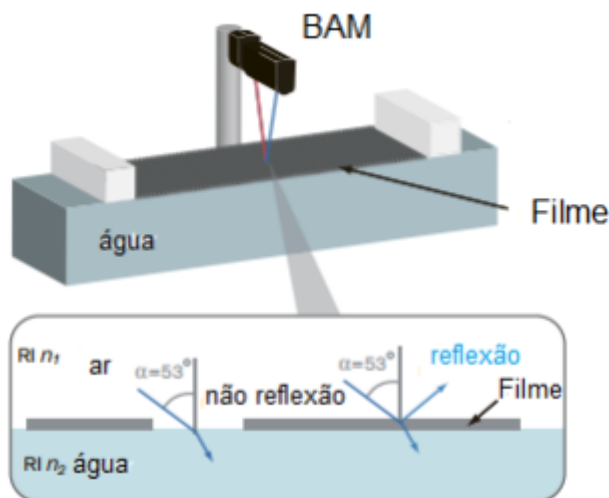
### 2.3.3 Microscopia no Ângulo de Brewster - BAM

A fim de caracterizar morfologicamente os filmes nanoestruturados, imagens bidimensionais podem ser de grande importância para compreender o comportamento e as características físicas e estruturais dos filmes de Langmuir. Sabe-se que a refletividade depende da polarização do feixe de luz incidente e do ângulo de incidência  $\alpha$ . Portanto, a microscopia no ângulo de Brewster faz uso da luz polarizada

'p' que, ao incidir em dois meios com índices de refração diferentes ( $n_2 > n_1$ ), não sofre reflexão, se  $\alpha$  (ângulo de incidência) é o ângulo de Brewster.

Quando há a presença de uma monocamada sobre a interface, o feixe de luz incidente não forma mais o ângulo de Brewster, desta maneira, a luz refletida pode ser observada em um microscópio situado no ângulo  $53^\circ$  (ângulo de Brewster), tornando possível a visualização de domínios presentes na interface aquosa com diferentes refletividades e abrindo margem para o estudo de suas características morfológicas (20).

**Figura 9.** Representação de um feixe de luz incidindo com ângulo em duas situações. Na primeira parte da representação, a luz incide sob uma superfície limpa contendo apenas água, sendo observado apenas o fenômeno de refração. Na segunda possível situação, o ângulo incidente é refratado, e também, refletido por conta da presença do filme na interface ar-água. Os índices  $n_1$  e  $n_2$  representam os índices de refração do ar e da água respectivamente.



Adaptado de <https://www.biolinscientific.com/blog/brewster-angle-microscopy-a-powerful-tool-for-thin-film-visualization>

A equação 3 representa o cálculo do ângulo de Brewster:

$$\tan \alpha = n_2/n_1 \quad (3)$$

Em que,  $n_1 = 1$  (índice de refração do ar) e  $n_2 = 1,3333$  (índice de refração da água) desta maneira, é obtido um ângulo de Brewster de  $53^\circ$  para esta interface.

As imagens obtidas através de BAM evidenciam diferentes luminosidades dependendo das moléculas que fazem presente na monocamada. Onde não há reflexão de luz, entende-se que somente existe a presença de água límpida e clarões onde há presença do filme.

Esta técnica pode ser usada para caracterizar e correlacionar os pontos de transições das isotermas obtidos pelos filmes de Langmuir (21).

### 2.3.4 Dinâmica Molecular

O método de dinâmica molecular, desenvolvido por Alder e Wainwright no final da década de 50, veio com o objetivo de testar modelos e oferecer *insights* ou pareceres sobre resultados experimentais.

Nas dificuldades em que a mecânica estatística não consegue resolver por completo, a metodologia de DM pode ser de grande utilidade a fim de mimetizar, por exemplo, uma técnica ou modelo experimental, trazendo informações de extrema importância como forças de ligação, posicionamento, energia livre entre outras.

A maioria dos modelos de dinâmica molecular seguem a linha de raciocínio em que as equações da mecânica clássica são aplicadas para descrever a dinâmica de átomos e moléculas, o que torna mais simples os modelos de cálculo e permite derivar leis da mecânica clássica baseadas na mecânica quântica (22).

Desta forma, para o entendimento da DM, pode-se partir da equação de movimento de Newton.:

$$F = m_i(d^2r_i/dt^2) \quad (4)$$

Onde:

Partícula “i”

$m_i$  – Massa da partícula “i”

$r_i$  – Posição da partícula “i”

T – Tempo

F – Resultantes das forças atuantes na partícula

Somando as forças resultantes em todas as partículas, consegue-se obter as configurações de velocidade e posição das mesmas, fazendo assim um melhor entendimento a nível microscópico e macroscópico do sistema (23) (24).

As forças que atuam na partícula podem ser divididas em intramoleculares e intermoleculares. As forças intramoleculares são baseadas em parâmetros empíricos, definindo ângulos de ligação, estiramentos e termos relacionados a torções de ângulos diedros. Já as forças intermoleculares determinam como moléculas diferentes interagem entre si.

O potencial de Coulomb pode ajudar a gerar dados sobre as interações entre os grupos polares iônicos. Já o potencial de Lennard-Jones leva em conta tanto interações atrativas quanto as repulsivas entre duas partículas e é demonstrado pela equação:

$$V(r)=4\varepsilon \left[ \left( \frac{a}{r} \right)^{12} - \left( \frac{a}{r} \right)^6 \right] \quad (5)$$

Em que “ $r$ ” é a distância entre as partículas, “ $\varepsilon$ ” é o poço potencial e “ $a$ ” uma constante de dimensão comprimento.

As condições periódicas de contorno são de extrema importância nas simulações de dinâmica molecular, pois impedem que aconteçam erros de efeito de superfície (25).

## 2. Fitoterápicos

A ingestão de ervas e folhas é uma atividade milenar e talvez uma das primeiras formas de utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos, com a finalidade da cura de doenças e alívio de dores. As substâncias orgânicas, em sua maioria, advêm da natureza, contribuindo significativamente e até essencialmente para o fornecimento de metabólitos secundários com um valor agregado gigantesco, podendo ser aplicadas como medicamentos, cosméticos, alimentos, agroquímicos

entre outros (26). Essas substâncias também servem como protótipos para a descoberta ou o desenvolvimento de produtos sintéticos mais específicos e seletivos (27).

Frente a vasta gama de produtos advindos da natureza utilizados pela indústria farmacêutica destacam-se os óleos essenciais, que podem ser originados a partir do ácido melavônico através de duas rotas biossintéticas possíveis: a série terpênica e a dos fenilpropanoides (28).

Propriedades naturais como bactericidas, fungicidas e inseticidas são muito procuradas pelas indústrias farmacêuticas, agronômicas e sanitárias nos óleos essenciais de plantas (29).

Além dessas, outras funções biológicas e fisiológicas podem ser encontradas nestes produtos naturais devido a sua vasta composição química, oferecendo ações anti-inflamatórias e antiespasmódicas, por exemplo.

Os óleos essenciais podem ser definidos como uma mistura de compostos lipofílicos, ou seja, quem tem afinidade e são solúveis em lipídeos (óleos e gorduras vegetais), de baixo peso molecular e geralmente odoríferos (com odor característico). Através de análises físico-químicas, é possível observar a composição destes diferentes óleos essenciais sendo formadas basicamente por hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas responsáveis pelas características físico-químicas e biológicas do composto. Compostos esses que podem ser obtidos através de destilação por arraste a vapor de água de diversas partes dos vegetais (30).

Os terpenoides, a maior classe de hidrocarbonetos encontrada em produtos naturais, são classificados mediante a quantidade de isoprenos (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais, os compostos terpênicos mais abundantes são o monoterpeno ( $C_{10}$ ) e o sequiterpeno ( $C_{15}$ ), compostos esses líderes em estudos farmacológicos devido a sua alta atividade biológica (31).

O timol e seu isômero carvacrol, compostos presentes na composição dos óleos essenciais, se destacam por sua atividade antimicrobiana. Estes monoterpenos aromáticos são os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas

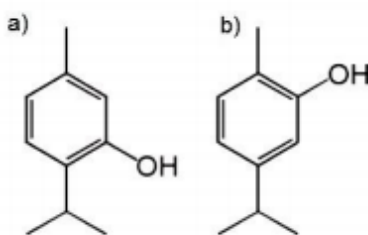
aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanum compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (32).

Esses compostos apresentam características farmacológicas muito importantes, sendo usados como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico. Tendo em vista sua vasta gama de possibilidade de atuação, trabalhos têm sido realizados para esclarecer o mecanismo de ação desses compostos, entretanto, as informações encontradas não foram sumarizadas e ainda estão muito dispersas, impedindo a formulação de uma conclusão sólida sobre seus mecanismos de ação.

## 2.1 O Timol

O timol 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol e seu isômero carvacrol 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, são monoterpenos, encontrados em plantas aromáticas, que podem ser obtidos através da biossíntese de  $\gamma$ -terpineno e do p-cimeno (33). O timol foi sintetizado pela primeira vez por Caspar Neumann em 1719 (34); e sua estrutura é muito semelhante a do carvacrol, diferindo apenas a posição do grupo hidroxila no anel fenólico, como pode ser visto na Figura 10 (35).

Figura 10. Estrutura molecular (a) timol e (b) carvacrol



Adaptado de Peixoto-Neves D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhães, P.J.; Ceccatto, V.M.; Coelho-De-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24, 341-350, 2010.

Ambos possuem fórmulas moleculares iguais a C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O e massas moleculares de 150,22 g.mol<sup>-1</sup>. No entanto, o carvacrol apresenta-se na forma líquida em temperatura ambiente cuja solubilidade em água é de 830 ± 10 ppm (36). Já o timol, em temperatura ambiente, encontra-se na forma de cristais (37).



## 2.2 Sua atividade bactericida

A fim de identificar e desenvolver novos compostos com tais propriedades, a atividade bactericida dos compostos é objeto de diversos estudos na área da fitoterapia, entre eles, destacam-se diferentes tipos de óleos essenciais de plantas com timol como principal componente. Estudos têm demonstrado que essa atividade bactericida está principalmente relacionada à interação do composto com as membranas celulares de diferentes microrganismos.

Através do uso das bactérias patogênicas *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> (Gram-negativas) e *Salmonella Typhimurium* (Gram-negativas), avaliou-se a atividade bacteriana do timol e do carvacrol. Para tornar visível a permeabilidade da membrana, foi utilizada uma sonda fluorescente hidrofóbica de N-fenil-N-naftilamina (NPN). Por meio desse experimento, pode-se observar o aumento da intensidade da fluorescência total causada pelo distúrbio causado pela estrutura da membrana externa, o que permite que o NPN entre na membrana interna, o que não ocorre quando a célula bacteriana está intacta.

Determinado estudo também utilizou de marcadores fluorescentes para avaliar o mecanismo de ação dos monoterpenos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Observou-se que o mecanismo de ação do timol e do carvacrol estava relacionado à sua capacidade de atravessar as membranas celulares, o que causava considerável interferência na membrana plasmática do corpo humano. Considerando a lipofilicidade, essa capacidade é diretamente suportada pelas propriedades físicas e químicas da molécula (38).

Com a finalidade de mensurar e correlacionar a atividade dos compostos com a suas capacidades em permeabilizarem e despolarizarem a membrana citoplasmática, realizou a quantificação da fluorescência utilizando o iodeto de 3,3'-dietiloxacarbocianina (DIOC<sub>2</sub>) como corante (39). A partir dos ensaios realizados, foi possível demonstrar a diminuição da intensidade absoluta da fluorescência em consequência das alterações ocasionadas sobre a permeabilidade da membrana, devido a sua interação com estes compostos. Também observou-se que o carvacrol despolariza a maioria das células das bactérias Gram-positivas variando diretamente do tempo e da concentração (40).

Com a finalidade de estudar a correlação entre a atividade antibacteriana do carvacrol e sua capacidade de alterar a membrana externa, foi empregada a técnica de microscopia de força atômica na membrana externa de diferentes bactérias (41). A partir dos resultados deste estudo, foi possível comprovar que este composto realmente afeta a membrana externa das bactérias, visto que as imagens de todas as linhagens de células tratadas evidenciaram alterações significativas na estrutura de sua superfície celular, seguidas da diminuição de seus comprimentos e diâmetros.

Também observaram através de experiências em membranas isoladas, que o mecanismo secundário de ação do timol e carvacrol está associado com a capacidade inibitória da atividade da enzima ATPase, pois a inibição ocorre no mesmo intervalo de concentração necessário para acontecer a ruptura da membrana (42). No entanto, os autores citam que a inibição da enzima pode desempenhar uma função significativa na redução da taxa de crescimento das bactérias em concentrações subletais.

A partir de outro experimento, foi verificado que a ação antimicrobiana do composto carvacrol e do seu isômero timol frente as bactérias (*E. Coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium, *Pseudomonas fluorescens* e células de *Brochothrix thermosphacta*) no invólucro celular, está relacionada com perda da integridade da membrana e liberação de prótons, que foram confirmadas por alterações consideráveis do perfil de ácidos graxos das células destes microrganismos e também devido a ocorrência de modificações estruturais das células (43).

Diferentemente do que foi observado por (40) e (43) ao avaliar como o carvacrol causava alterações na membrana das bactérias de *Bacillus cereus* por ensaios de luminescência e de fotometria de chama, verificou-se que a exposição ao carvacrol leva a uma diminuição da concentração de ATPintracelular, mas não aumentando proporcionalmente o ATPextracelular. Desta forma, concluiu-se que o carvacrol parece não aumentar a permeabilidade da membrana para o ATP, mas possibilita a passagem para prótons K<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> através das membranas, intensificando sua permeabilidade e consequentemente prejudicando os processos essenciais para as células.

Estudos de com bacterias *Bacillus cereus*, mostraram que o efeito antibacteriano do timol e do carvacrol deve-se majoritariamente ao seu grupo hidroxila, o qual funciona como um transportador de cátions monovalentes entre as membranas, responsáveis pelo crescimento das células (44).

O mesmo foi obtido ao analisarem a relação entre a estrutura química e a capacidade antimicrobiana do carvacrol e de seus dois derivados, carvacrol metil éter e o acetato de carvacrila, frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus plantarum*, onde a presença do grupo OH livre se mostrou fundamental para a atividade antibacteriana do composto, visto que os compostos sintetizados não foram eficazes como agentes antibacterianos para os microrganismos testados (45).

Os autores sugeriram que o carvacrol possui atividade antimicrobiana relacionada a suas características hidrofóbicas adequadas, que permitem a acumulação do composto na membrana celular, devido a sua capacidade em fazer ligação de hidrogênio e liberar prótons, que por consequência induzem a modificação da conformação da membrana e resultam na apoptose celular.

Por outro lado, a ausência do grupo hidroxila livre na estrutura do carvacrol metil éter e o acetato de carvacrila não permite que ocorra a troca de prótons entre os compostos e a membrana, e desta maneira não modificam sua permeabilidade. (45)

## **2.3 A atividade antifúngica**

Os fungos, por apresentarem resistência aos antibióticos e antifúngicos convencionais, geram uma grande necessidade de se entender o mecanismo de ação dos compostos timol e carvacrol sobre eles, o que facilita o uso desses produtos naturais.

Por esta razão, estudos foram realizados a fim de observar o comportamento e interferência do timol na formação do biofilme fúngico mediante às estirpes de *Candida albicans* (46). Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência evidenciaram que o principal mecanismo de ação antifúngica do composto se deve à alteração das estruturas 3D dos biofilmes de forma dependente da concentração (CMI de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os autores observaram

que quase todas as células de controle possuíam emissão fluorescente verde, enquanto que após a incubação com timol houve a redução da quantidade de células e alterações em suas formas filamentosas com a presença de glóbulos vermelhos, restando apenas poucas células verdes viáveis.

De maneira análoga, também conferiram a atividade antifúngica do óleo essencial de tomilho perante os fungos fitopatogênicos *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium moniliforme* aos seus compostos carvacrol e o timol, que demonstraram sua capacidade em causar danos à membrana citoplasmática (47).

Atribuíram esta capacidade às ligações que estes compostos podem realizar por meio de seus grupos OH com os grupos amina e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas, o que ocasiona uma alteração da permeabilidade da membrana, levando a liberação do conteúdo celular (48).

Avaliou-se os mecanismos de ação antifúngica dos compostos, timol e carvacrol, frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, observando-se que estes compostos possuem a capacidade de facilitar a troca de íons no meio celular dos fungos, como a entrada de  $H^+$  e  $K^+$ , aumentando assim a permeabilidade da membrana e dificultando a sobrevivência da célula por atrapalhar os processos essenciais como o transporte de elétrons, além disso, impedem ainda o influxo de  $Ca^{2+}$  nos compartimentos celulares (49).

Estudou-se também os mecanismos de ação antifúngica dos compostos, timol e carvacrol, em relação as alterações causadas na permeabilidade da membrana celular de espécies de *Candida*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, bem como cepas padrão de *Candida albicans* (50). Os resultados obtidos demonstraram que os compostos exibem atividade fungicida através da alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, como resultado da inibição da biossíntese do ergosterol de um modo semelhante ao fluconazol.

### 3.0 Objetivos

Neste estudo, o timol, obtido através do óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides*, foi isolado e incorporado em monocamadas de Langmuir de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) e brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e investigado com tensiometria (isotermas de pressão de superfície-área), espectroscopia vibracional específica (espectroscopia de absorção-reflexão no infravermelho com modulação da polarização), microscopia no ângulo de Brewster e Simulação por Dinâmica Molecular. Este trabalho teve como principal objetivo a obtenção de informações a nível molecular sobre a forma como esta substância interage com membranas celulares, além de analisar a influência da carga do fosfolípido com relação a adsorção da droga sob a monocamada.

## **4.0 Procedimentos Experimentais**

### **4.1 Instrumentação**

Os experimentos mencionados neste trabalho de conclusão de curso foram realizados no laboratório de materiais híbridos da Universidade Federal de São Paulo, campus Diadema. Isotermas de pressão de superfície versus área por molécula, espectros de absorção-reflexão na região do infravermelho (PM-IRRAS) e as imagens de microscopia no ângulo de incidência de Brewster foram obtidas através de uma cuba de Langmuir da KSV Instruments®, com sistema de pressão superficial e barreiras móveis acopladas, assim como o espectrofotômetro do tipo PM-IRRAS (PMI-50) e miniBAM da mesma empresa.

Os espectros de infravermelho foram obtidos com resolução espectral de  $8\text{ cm}^{-1}$ , e um ângulo de incidência da luz polarizada de  $80^\circ$  com relação à normal em um tempo de aquisição espectral de 20 minutos para cada análise. As imagens de microscopia no ângulo de Brewster foram obtidas a uma resolução de imagem de  $12\text{ }\mu\text{m}$  e campo de visão de  $3600 \times 4000\text{ }\mu\text{m}$ .

Os experimentos, em todas as suas etapas, fizeram uso de água purificada pelo sistema Milli-Q-Plus® (resistividade  $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}$ , pH 5,5 a  $25^\circ\text{C}$ ). Todos os experimentos foram conduzidos a uma temperatura de  $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , em ambiente fechado e com nível de poeira controlado.

As simulações moleculares foram realizadas com o pacote GROMACS® e 4000 moléculas de água estavam ao centro da caixa entre duas monocamadas lipídicas formadas a partir de 32 moléculas de DPPC cada. Onde não se encontram moléculas do lipídio e de água foi estabelecido o sistema de vácuo e a configuração inicial é gerada com o programa Packmol.

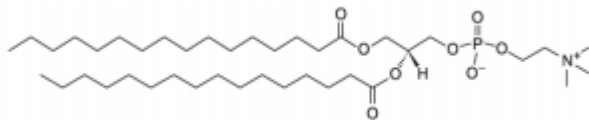
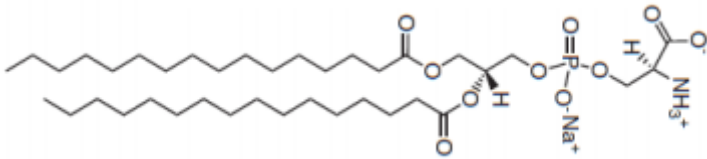
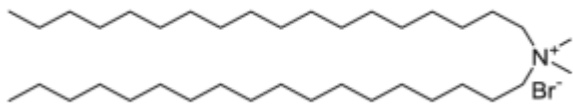
### **4.2 Reagentes e soluções**

Para a formação da monocamada de Langmuir, foram usados cinco diferentes lipídios, sendo estes dissolvidos em clorofórmio comprado da empresa Synth® e com concentração de  $0,5\text{ mg/mL}$ . Foram utilizados para preparar as monocamadas: um

fosfolípido negativo, dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), um zwitteriônico, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), um lípido positivo, brometo de dioctadecildimetilamonio (DODAB), e um esteroide, o Colesterol. Todos esses comprados da Sigma-Aldrich® e usados sem adicional purificação. A Tabela 1 apresenta as estruturas dos diferentes compostos utilizados na síntese dos diferentes filmes de superfície.

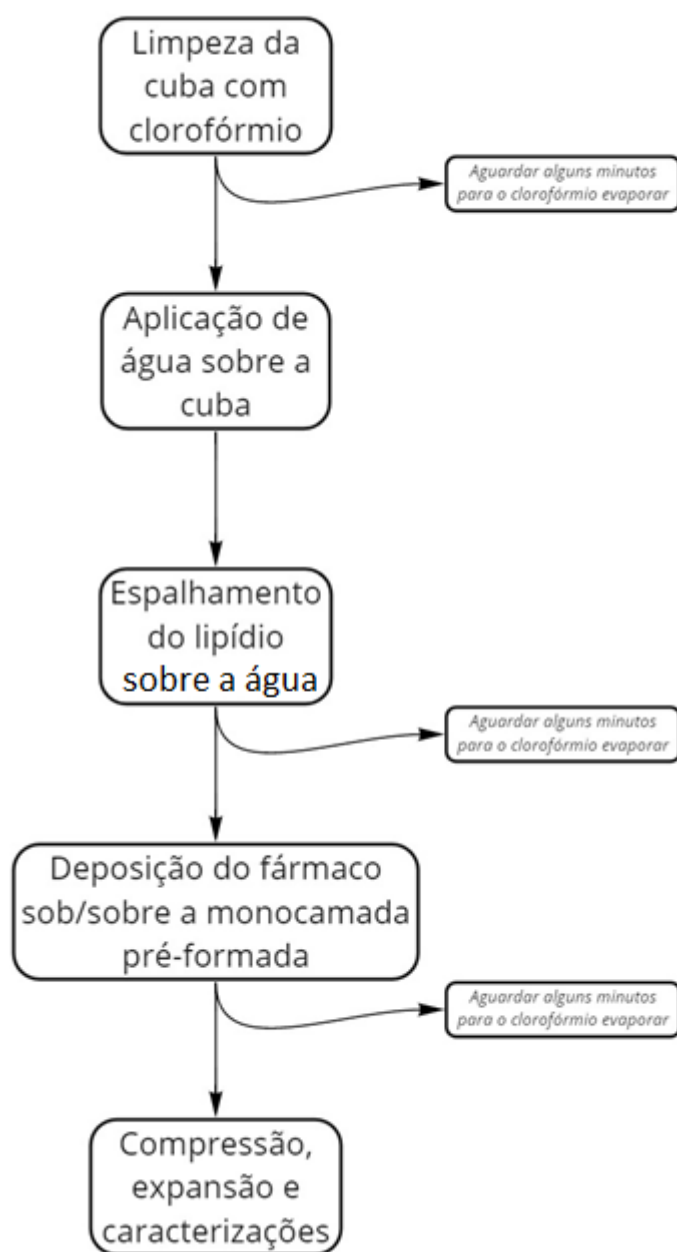
O composto timol foi-nos cedido em colaboração com o grupo de bio-orgânica da Unifesp-Diadema, liderado pelo prof. João H.G. Lago, hoje pesquisador da UFABC.

**Tabela 1.** Estrutura dos lipídios utilizados na construção dos diferentes filmes de Langmuir.

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA MOLECULAR
DPPC	
DPPS	
DODAB	

O esquema do procedimento experimental pode ser visualizado na figura 11:

**Figura 11.** Esquema representando o pass-a-passo para caracterização de monocamadas na cuba de Langmuir



### 4.3 Caracterização para os filmes de Langmuir

#### 4.3.1 Caracterização por Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A)

Todas as isotermas representadas neste trabalho foram geradas a partir da redução da área ocupada pelo filme na cuba. Essa redução da área ocupada pelo



filme se deve ao movimento de encontro das barreiras hidrofílicas, com velocidade constante de  $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $5 \text{ Å}^2 \text{ molécula}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

A fim de avaliar o comportamento tensoativo do composto estudado, a primeira análise realizada foi a atividade superficial do timol, espalhando uma solução em clorofórmio do composto na interface ar-água e comprimindo a superfície até o limite de compressão.

Para as monocamadas lipídicas, puras ou misturadas com o timol, foram realizados experimentos específicos para cada lipídio. Primeiramente, acrescentaram-se  $35 \text{ µL}$  da solução do lipídio zwitteriônico DPPC, esperou-se 10 minutos para evaporação do solvente, e iniciou-se a compressão da interface, obtendo a isoterma  $\pi$ -A correspondente. Após expansão da monocamada, em seguida foram adicionados  $10 \text{ µL}$  da solução de timol, 10 minutos foram esperados, e obteve-se novamente uma nova isoterma  $\pi$ -A nas mesmas condições prévias. Após este primeiro ensaio, o sistema foi reaproveitado para adicionar mais  $10 \text{ µL}$  da solução de timol (completando agora  $20 \text{ µL}$ ) e, por fim, mais  $10 \text{ µL}$  da solução de timol, totalizando  $35 \text{ µL}$  de DPPC e  $30 \text{ µL}$  de timol, e obtiveram-se isotermas  $\pi$ -A correspondentes para cada composição lipídio: timol. Para todos os casos, as medidas de pressão superficial foram realizadas em função da área disponível por molécula, o que foi feito com medidas sucessivas da pressão à medida que a área da monocamada era diminuída através de barreiras móveis.

Este mesmo procedimento citado acima foi realizado com três diferentes lipídios. A concentração estoque da solução de timol utilizada em todos os experimentos foi de  $0,5 \text{ mg/mL}$ .

#### **4.3.2 Caracterização por PM-IRRAS**

O sistema foi preparado para a caracterização por PM-IRRAS, comprimindo a monocamada até a pressão desejada, com velocidade constante de  $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . A obtenção do espectro leva cerca de 10 minutos, sendo que neste intervalo de tempo as barreiras mantêm a pressão superficial constante. Ao final era obtido um espectro através da média de 6000 espectros bem sucedidos. O ângulo de incidência do feixe em relação à normal à interface foi de  $80^\circ$ .

Para realizar o PM-IRRAS, utilizou-se de 30 $\mu$ L de timol e para o fosfolipídio em questão 35 $\mu$ L. Fez-se o espectro para o filme descomprimido ( $\pi = 0$  mN/m) e para o filme não pressões de  $\pi = 10$  mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

#### **4.3.3 Caracterização por Microscopia no Ângulo de Brewster (BAM)**

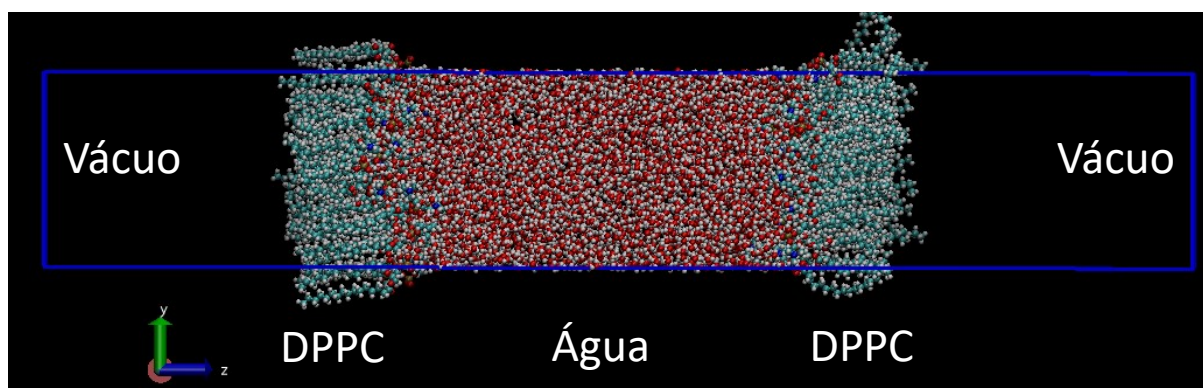
Na caracterização por BAM, o volume de lipídio usado não foi controlado, pois seu uso era apenas para atingir a pressão de 30mN/m, que é a pressão superficial que corresponde às propriedades termodinâmicas de membranas em sistemas biológicos reais, variando na faixa de 80-100 $\mu$ L. O volume de timol usado foi de 10  $\mu$ L, visto que com essa quantidade, já pode-se obter resultados comprobatórios dos domínios formados, não se viu necessário utilizar de mais fármaco.

Para tal fim, utilizou-se um microscópio no ângulo de Brewster na marca KSV (modelo mini-33 BAM). As imagens mais representativas da morfologia da interface ar-água foram selecionadas e mostradas nesse trabalho.

#### **4.3.4 Caracterização por dinâmica molecular**

Neste trabalho, utilizou-se de simulações de dinâmica molecular como ferramenta que pudesse nos informar com maior precisão a localização mais provável das moléculas de timol no modelo de membrana. Para isto, realizou-se o cálculo para obtenção do potencial de força media (PMF), que representa a energia livre do timol em regiões diferentes do filme. Neste cálculo, uma molécula de timol foi colocada no vácuo (referência, isto é, PMF = 0 kJ.mol<sup>-1</sup>) e gradativamente foi empurrada ao longo do eixo Z na direção do filme de DPPC, até atingir a fase aquosa no interior do filme. Ao longo deste trajeto foram calculadas a energia do timol em cada região.

**Figura 12.** Representação computacional da monocamada lipídica obtida através do programa PACKMOL



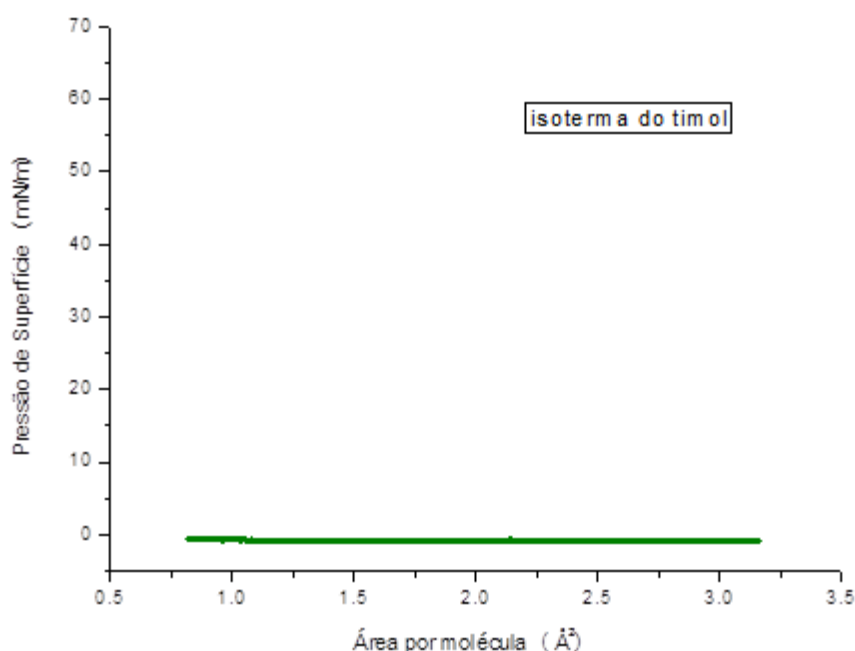
## 5.0 Resultados e Discussões

### 5.1 Isotermas de Pressão

#### 5.1.1 Timol

Primeiramente foi testada a atividade superficial da droga sozinha em água através de uma isoterma  $\pi$ -A. A partir do gráfico apresentado na figura 13, é notória a pressão superficial constante à medida que aumenta a área por molécula. Como o composto é insolúvel em água e, portanto, hidrofóbico, é provável a agregação do monoterpeno espalhado na interface ar-água. Portanto as forças de coesão devem prevalecer frente às forças de adesão.

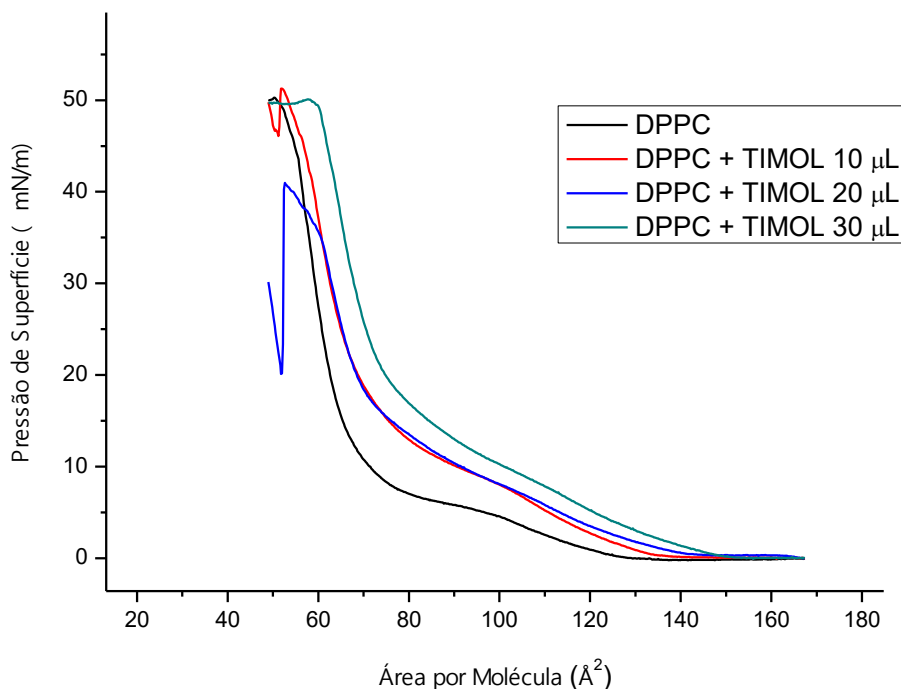
**Figura 13.** Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) da droga timol pura espalhada em água



### 5.1.2 DPPC e Timol

Na figura 14, a curva preta representa a isoterma para o DPPC. Na região entre 170 e 140 Å² o lipídio se apresenta a fase gasosa, na qual as moléculas estão razoavelmente distantes entre si, logo, a pressão superficial é próxima de zero. Na região entre 140 e 110 Å² a monocamada está na fase líquido expandido (LE), sendo o início do rearranjo estrutural, de modo que, com a aproximação das moléculas, as interações intermoleculares começam a ser mais significativamente sentidas. Já na região entre 110 e 70 Å² a monocamada se apresenta na fase líquido-condensada (LC), na qual as moléculas começam se aproximar de tal forma que é possível aumentar as forças de interação intermolecular, diminuindo a compressibilidade superficial (maior taxa de aumento de pressão em relação à diminuição da área da monocamada). Em áreas menores que 60 Å² ocorre o colapso do filme, com a possibilidade das moléculas formarem bicamadas ou agregados.

**Figura 14.** Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) do fosfolipídio DPPC puro espalhado em água e também do mesmo com timol nas quantidades 10, 20 e 30  $\mu\text{L}$ .



Na presença da droga, observa-se condensação do filme de Langmuir, possivelmente devido à interação entre o timol e as cabeças polares do fosfolipídio, minimizando as repulsões entre elas e aumentando, portanto, a capacidade de compressão do filme.

Na adição de 10  $\mu\text{L}$  de timol (curva vermelha) o filme apresenta o efeito conhecido como “condensação da monocamada”, que é caracterizado pelo deslocamento da curva para áreas maiores em relação à curva para o DPPC puro, fenômeno visível em maiores estágios de compressão. Porém, as fases bidimensionais continuam bem definidas, com a observação de que o colapso ocorre em pressões relativamente mais baixas. Isso possivelmente ocorre devido a algum efeito desestabilizador do timol. Após a adição de mais 10  $\mu\text{L}$  de timol, representado pela curva azul, não houve alteração significativa perante a corrida anterior, talvez isso seja explicado por uma fase de estabilização da monocamada frente a quantidade de timol adicionada.

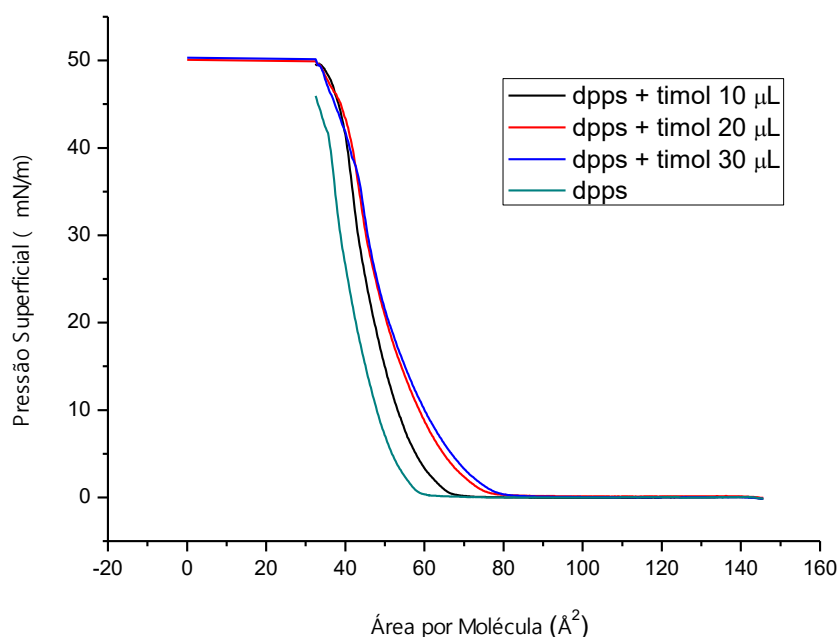
Por fim, ainda são adicionados mais 10  $\mu\text{L}$  da droga (curva verde), o filme apresenta uma considerável estabilidade ante as outras três, possivelmente em virtude de um rearranjo molecular de menor energia. Essa estabilidade pode ser

observada tanto devido à maior condensação da monocamada (maior capacidade de compressão a áreas menores), como maior pressão de colapso (maior capacidade de compressão a pressões maiores).

### 5.1.3 DPPS e Timol

Abaixo, na figura 16, encontram-se representadas às isotermas  $\pi$ -A obtidas para a compressão do DPPS puro e na presença da droga estudada, respectivamente. Pode-se verificar novamente que o timol torna a área média disponível por molécula de lipídio menor, que por sua vez é traduzido como a condensação da monocamada na interface, expandindo para áreas maiores.

**Figura 15.** Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) do fosfolipídio DPPS puro espalhado em água e também do mesmo com timol nas quantidades 10, 20 e 30  $\mu$ L.

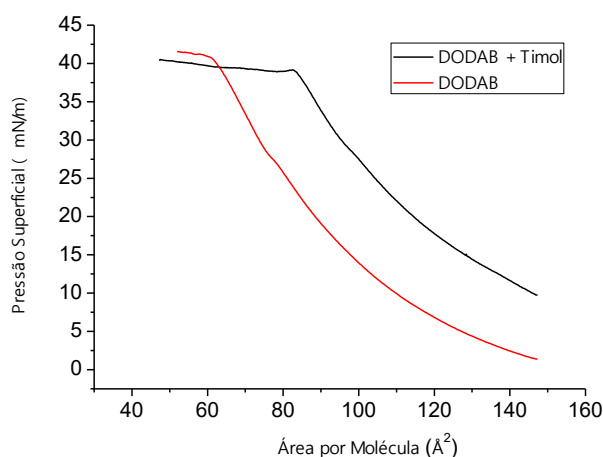


### 5.1.4 DODAB e Timol

A Figura 17 representa a isoterma  $\pi$ -A para o lipídio sintético DODAB. O perfil de compressão deste lipídio indicam que, diferentemente dos sistemas discutidos até então, o DODAB apresenta grande fluidez, evidenciada por uma longa fase liquido-expandida, que ocorre desde a região de baixas pressões de superfície, seguida de uma breve fase líquido-condensada nos instantes anterior ao seu colapso.

Observa-se que a adição de timol à fase aquosa foi capaz de promover sua condensação na interface, provocando significativa alteração no perfil da isoterma de compressão do lipídio, entretanto a pressão de colapso não variou muito, se mantendo entre 40 e 42 mN.m<sup>-1</sup>, indicando assim, a estabilidade do filme na presença da droga.

**Figura 16.** Isotermas de Pressão x Área ( $\pi$ -A) do fosfolipídio DODAB puro espalhado em água e também do mesmo com timol 30  $\mu$ L.



Novamente, pode-se perceber que apesar do lipídio utilizado na construção da monocamada apresentar carga efetiva (não ser zwitteriônico ou neutro no pH de análise), sua condensação frente a adição do monoterpene fenólico também pode ser notada, o que permite concluir que os deslocamentos das isotermas  $\pi$ -A para regiões de menores áreas ocupadas por molécula, observados até então para os diferentes sistemas lipídicos, é independente da carga apresentada pela região polar das moléculas constituintes do filme de superfície.

## 5.2 PM-IRRAS

### 5.2.1 DPPC e Timol

As Figuras 17 e 18 mostram bandas do PM-IRRAS da droga timol dispersa em DPPC nas pressões de 0 mN/m, 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m. Utilizou-se o intervalo de 1000 cm<sup>-1</sup> à 1800 cm<sup>-1</sup> para a obtenção das bandas da parte hidrofílicas e de 2800 cm<sup>-1</sup> à 3000 cm<sup>-1</sup> para a parte hidrofóbica da monocamada.

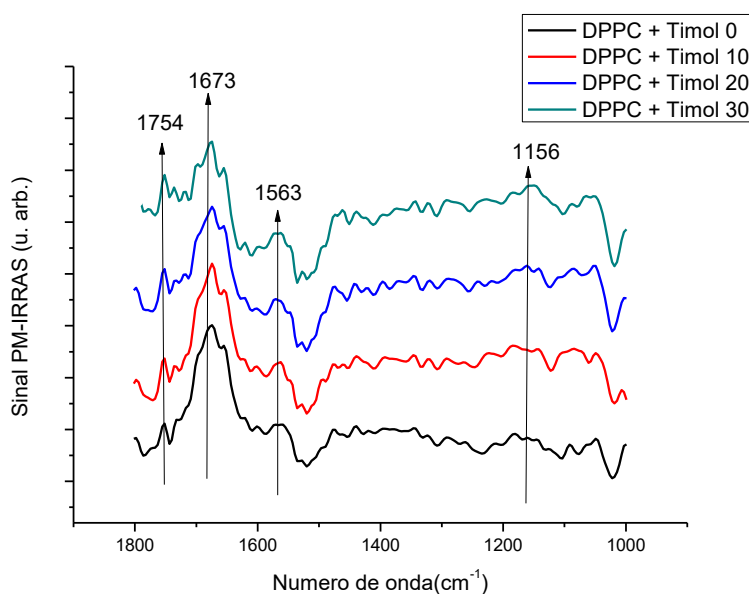
Na Figura 17, as bandas que podem ser destacadas estão em aproximadamente 1156cm<sup>-1</sup> representando o estiramento do fosfato, em 1563 cm<sup>-1</sup> e

$1673\text{cm}^{-1}$  representando as moléculas de água. O estiramento do  $\text{CH}_2$  se encontra na faixa de  $1460\text{cm}^{-1}$ . Já estiramento da carbolina ( $\text{C}=\text{O}$ ) é evidenciado pelo pico em  $1754\text{cm}^{-1}$ .

Na Figura 18, assim como para o PM-IRRAS do DPPC observam-se bandas mais relevantes para o estiramento do  $\text{CH}_2$ , sendo estas simétricas, na faixa de  $2849\text{cm}^{-1}$  e assimétricas na faixa de  $2914\text{cm}^{-1}$ . As regiões de  $3011\text{cm}^{-1}$  e  $3045\text{cm}^{-1}$  são evidências do anel aromático da molécula de timol.

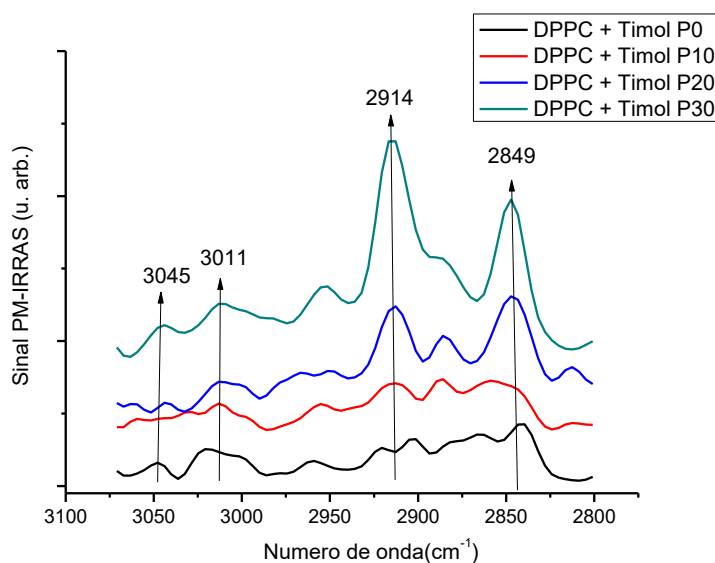
A partir da incorporação de pequenas quantidades de droga na monocamada de Langmuir, há um pequeno deslocamento das bandas para  $2900$  e  $2840\text{cm}^{-1}$ , assim como a revelação da presença de um pequeno “ombro”, possivelmente proveniente dos grupos  $\text{CH}_3$  ligado a molécula de  $\text{N}^+$  do DPPC.

**Figura 17.** Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPC e da droga timol entre  $1000 - 1800\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 10, 20 e  $30\text{mN.m}^{-1}$





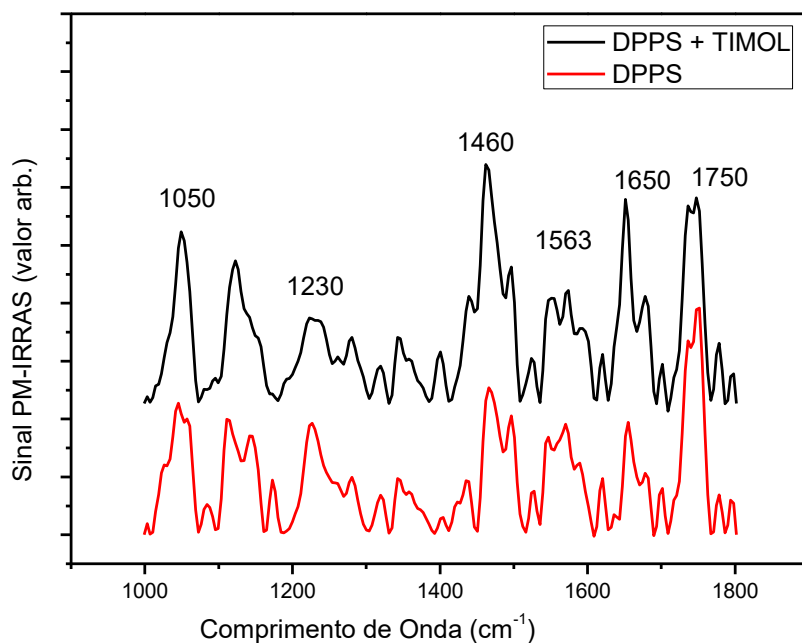
**Figura 18.** Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPC e da droga timol entre 2800 – 3000  $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 10, 20 e 30  $\text{mN.m}^{-1}$



### 5.2.2 DPPS e Timol

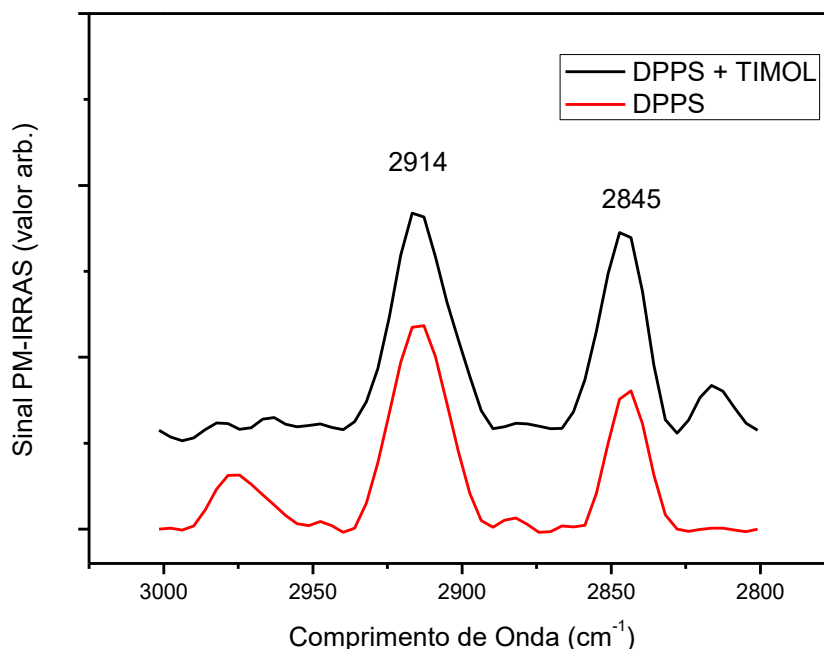
Na figura 19, a banda de absorção assimétrica do grupo carbonil da porção serina foi observada na região de 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Representando o estiramento das moléculas de água, bandas em 1563 $\text{cm}^{-1}$  e 1650 $\text{cm}^{-1}$ . Já o sinal de absorção do P=O assimétrico, é caracterizada pela banda alargada em 1230  $\text{cm}^{-1}$ . Já o P=O simétrico se encontra na região de 1050  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 19.** Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPS e da droga timol entre 1000 – 1800  $\text{cm}^{-1}$ , na pressão de 30  $\text{mN.m}^{-1}$



Na Figura 20, assim como para o PM-IRRAS do DPPC observam-se bandas mais relevantes para o estiramento do  $\text{CH}_2$ , sendo estas simétricas, na faixa de  $2845\text{cm}^{-1}$  e assimétricas na faixa de  $2914\text{cm}^{-1}$ .

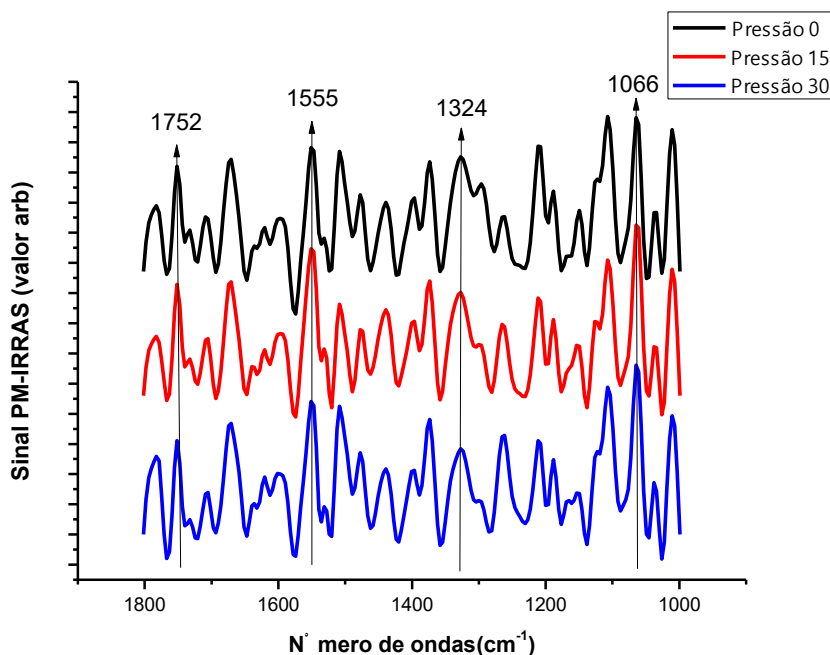
**Figura 20.** Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DPPS e da droga timol entre 2800 – 3000  $\text{cm}^{-1}$ , na pressão de 30  $\text{mN.m}^{-1}$



### 5.2.3 DODAB e Timol

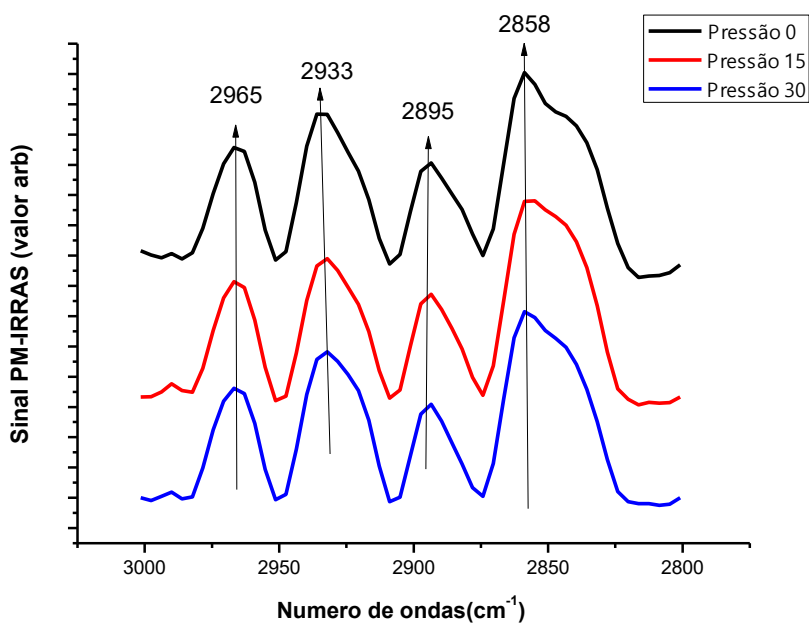
A Figura 21, a região de 1500 a 1760  $\text{cm}^{-1}$  não apresenta bandas tão evidentes para o DODAB, porém apresenta bandas centradas em 1555 e 1752  $\text{cm}^{-1}$  que são atribuídas ao dobramento angular da água e estão relacionadas as regiões cobertas e não cobertas pela camada lipídica. Essas bandas podem ser relacionadas à reidratação das cabeças polares do lipídio DODAB na monocamada. Além disso, verifica-se a presença de uma possível banda entre 1661 e 1629  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser relacionada a estiramentos C=O.

**Figura 21.** Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DODAB e da droga timol 1000 – 1800  $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 15 e 30  $\text{mN.m}^{-1}$



De acordo com a literatura (51), as bandas observadas em 2858 e 2933  $\text{cm}^{-1}$  são características dos estiramentos  $\text{CH}_2$  simétrico e antissimétrico respectivamente, e a banda em 2965  $\text{cm}^{-1}$  é característica do estiramento  $\text{CH}_3$ . Para a pressão 30  $\text{mN.m}^{-1}$  nenhum deslocamento foi observado para bandas do  $\text{CH}_2$  simétrico (2858  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\text{CH}_2$  antissimétrico (2933  $\text{cm}^{-1}$ ) quando expostos ao timol.

**Figura 22.** Comparação entre bandas de transição vibracional (PM-IRRAS) da monocamada composta pelo lipídio DODAB e da droga timol entre 2800 – 3000  $\text{cm}^{-1}$ , nas pressões de 0, 15 e 30  $\text{mN.m}^{-1}$



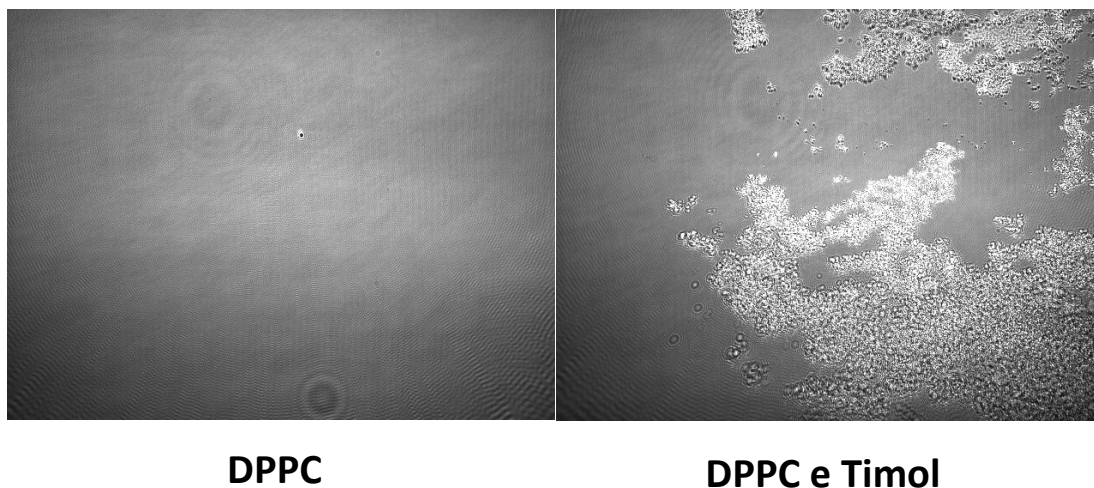
### 5.3 Microscopia no Ângulo de Brewster (BAM)

#### 5.3.1 DPPC e Timol

A figura 23 mostra um antes e depois da monocamada advinda do lipídio zwitteriônico (DPPC) sem a droga e com a droga, respectivamente. É notória a diferença entre as duas fotos tiradas da interface ar-água, a foto da esquerda onde se vê apenas um sistema cinza, evidencia um espalhamento uniforme e uma conformação dos fosfolipídios como um filme organizado, sem aglomerados. Já na imagem a esquerda, os borrões na cor mais clara evidenciam uma grande presença de agregados de maior densidade na superfície.

Vale ressaltar que a pressão no sistema em todos os experimentos foi de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ .

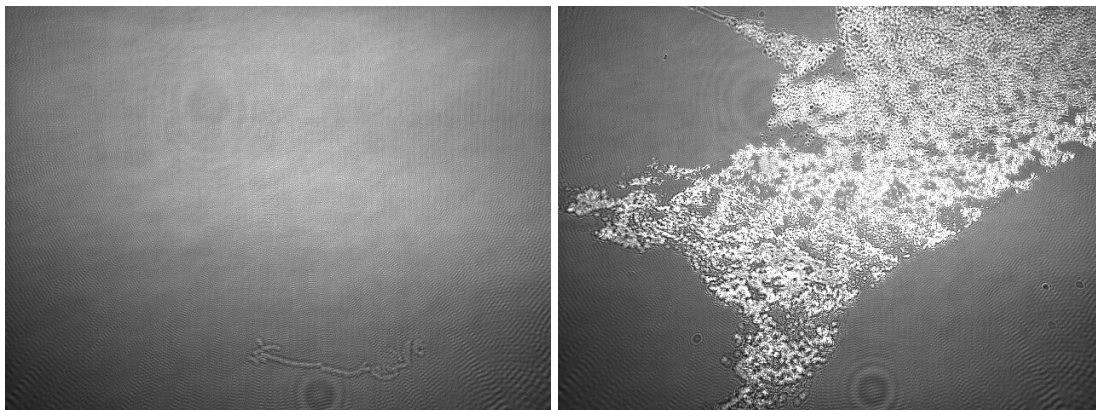
**Figura 23.** Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do filme de DPPC puro e na presença da droga timol, obtidas na pressão de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  (Resolução de  $3600 \times 4000 \mu\text{m}$ )



#### 5.3.2 DPPS e Timol

O mesmo acontece para a monocamada formada a partir do lipídio com carga formal negativa (DPPS), Figura 24. O antes e depois mostra a conformação organizada sem a droga, e após a adição da mesma os aglomerados são formados, sendo evidentes através das manchas claras.

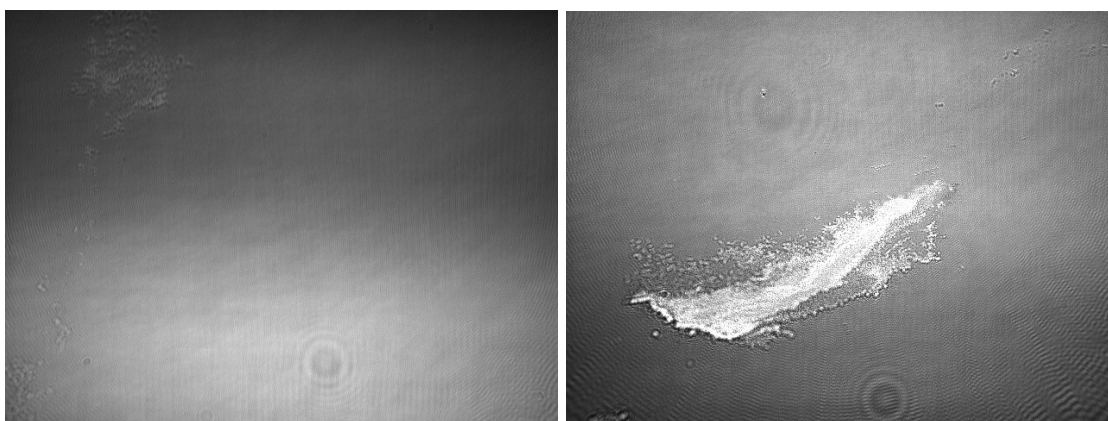
**Figura 24.** Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do filme de DPPS puro e na presença da droga timol, obtidas na pressão de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  (Resolução de  $3600 \times 4000 \mu\text{m}$ )



### 5.3.3 DODAB e Timol

Apesar da mesma situação citada anteriormente se repetir agora no lipídio sintético de carga formal positiva (DODAB), é interessante salientar a formação de um aglomerado, na Figura 25, menor na superfície comparado aos outros dois casos mostrados acima.

**Figura 25.** Imagens de microscopia no ângulo de Brewster do filme de DODAB puro e na presença da droga timol, obtidas na pressão de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  (Resolução de  $3600 \times 4000 \mu\text{m}$ )



É importante salientar também que no momento do experimento, obter as fotos após a adição da droga, evidenciando aglomerados nas monocamadas de DPPC e DPPS foi relativamente fácil, uma vez que haviam muitos aglomerados espalhados por toda a interface e com comportamento similar. Isso não aconteceu no caso do DODAB, onde esse pequeno aglomerado evidenciado na foto acima foi o único

encontrado na interface aquosa. Isso pode levar a uma prévia conclusão de que o lipídio de carga formal positiva se apresenta mais organizado e não sofre grandes alterações ou impactos mesmo após a adição da droga e a compressão da monocamada formada.

## 5.4 Dinâmica molecular

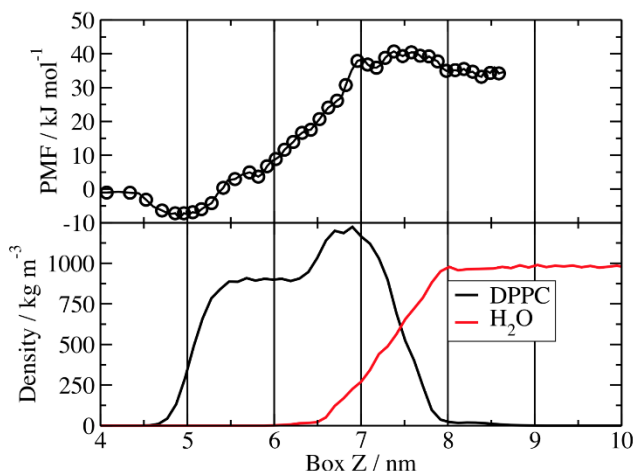
O timol é uma molécula hidrofóbica com alto coeficiente de partição, o que sugere que ele tem uma alta afinidade pela parte apolar dos lipídios. Dado o fato de que DPPC tem um domínio hidrofílico e outro domínio hidrofóbico, vale a pena investigar a localização preferencial do timol na monocamada DPPC. Por meio de simulação de dinâmica molecular, a preferencial localização da molécula de timol na bicamada formada foi realizada pelo cálculo do potencial de força média (PMF) ao longo do eixo – Z da caixa de simulação (52).

Da mesma forma, o PMF do timol através da monocamada / filme de água DPPC foi calculado, ou seja, o timol foi puxado da fase de vácuo para a fase da água, ao longo do eixo z da caixa de simulação. O painel superior da Figura 26 mostra o PMF do timol ao longo do eixo z, considerando como estado de referência o medicamento na fase de vácuo,  $\text{PMF} = 0,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

O painel inferior da Figura 26 representa a densidade de massa de DPPC e água, mostrando o vácuo-DPPC ( $z \sim 5 \text{ nm}$ ) e interfaces DPPC - água ( $z \sim 7,5 \text{ nm}$ ). Por volta de 5 nm, o PMF apresenta seus valores mínimos, em torno de  $-12,0 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , que corresponde ao timol na interface vácuo – DPPC. Entre 5,5 e 6,5 nm (fase apolar de DPPC) existe um platô no PMF em torno de  $12,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Puxando o timol para a monocamada DPPC, de 6,5 a 7,8 nm, o PMF aumenta linearmente até  $\sim 78 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Na interface DPPC - água e na fase de água,  $8 < z < 9 \text{ nm}$ , o PMF mostra uma oscilação em torno de  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Portanto, seguindo o perfil PMF, a localização preferencial do timol no modelo monocamada está na interface de vácuo - DPPC. Além disso, a energia livre de partição do timol do vácuo para a água é em torno de  $70 \text{ kJ mol}^{-1}$ . De acordo, a energia da partição obtida quando o timol é puxado da água para o vácuo é em torno de  $70 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

**Figura 26.** Potencial da força média calculada para o timol através das interfaces de vácuo-DPPC e DPPC-água a 300 K, representada no painel superior. A densidade de massa de DPPC e água foi calculada em 300 K (painel inferior).



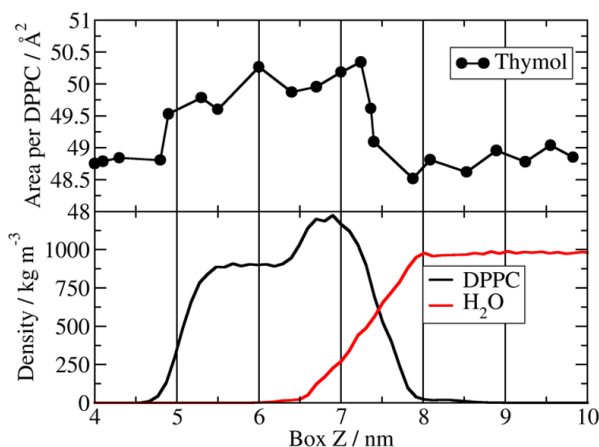
O painel inferior da Figura 26 mostra os resultados experimentais que apontam para o fato de o timol se localizar em regiões da cadeia do lipídeo no modelo do filme. Quando o timol está na fase aquosa, o sistema adquire uma pequena estabilização em relação à posição do timol na região cabeça polar-água. Dada a característica hidrofóbica do timol e segundo o PMF, o sistema deve ser mais estável quando o timol estiver em regiões próximas à interface vácuo-cauda do DPPC.

Conforme discutido anteriormente, a introdução de timol na monocamada de DPPC mudou as isotermas para áreas mais altas; para exemplo, com 1 e 2% de timol, o deslocamento foi de  $2 \text{ \AA}^2$  / molécula em comparação com a monocamada sem o terpeno. A área molecular é obtida de forma direta nas simulações.

A Figura 27 mostra a área molecular obtida na presença de timol em diferentes profundidades da monocamada de DPPC. Com timol na interface vácuo-DPPC a área molecular muda  $\sim 1 \text{ \AA}^2$ . Mudanças mais altas de  $\sim 2 \text{ \AA}^2$  são observadas com timol dentro da fase apolar do DPPC e na interface DPPC-água. Quando o timol atinge a fase aquosa, a área molecular volta a valores em torno de  $48,8 \text{ \AA}^2$ .



**Figura 27.** Quantidade de moléculas de timol por área molecular de DPPC ao puxar o filme em direção a monocamada (painel superior) e densidade de massa de DPPC e água calculado em 300 K (painel inferior).



A literatura relata que o timol se auto-agrega na água com uma concentração micelar crítica de 4  $\mu\text{M}$ , 22 acima da concentração usada na subfase aquosa em nosso estudo (50–100 nM), o que indica que o timol não está saturado na superfície em nosso caso. Em nosso trabalho, testamos concentrações consideravelmente mais baixas a fim de alcançar uma droga de menor proporção molecular DPPC.

Apesar disso, uma penetração perceptível pode ser inferida, as isotermas de área de pressão superficial mostraram que o timol, em concentrações relativamente pequenas, foi capaz de incorporar em monocamadas DPPC, expandindo-as e diminuindo sua ordem molecular. Esses fatos podem estar relacionados a uma interrupção da monocamada de lipídios compactada, que pode ser associada com a mudança na morfologia do filme de Langmuir desde a inserção da droga que induziu a formação de alguns domínios em contraste com o padrão homogêneo observado para DPPC em 30 mN / m.

Além disso, o potencial de força média obtido por simulação de dinâmica molecular apontou que o favorável posição do timol ao longo da monocamada de lipídeo está perto das caudas hidrofóbicas do DPPC. Esses resultados sugerem que o timol penetra na monocamada DPPC, com deslocamento de área compatível com simulação molecular e tensiometria.

Voltando aos espectros PM-IRRAS, observamos que apenas com esta técnica, não podemos ter certeza se as mudanças nas bandas para transições vibracionais de

fosfato após incorporação de timol estão relacionados a uma interação direta desta droga com fosfato ou devido à uma mudança na organização das moléculas de lipídio. No entanto, como os dados de simulação molecular sugerem uma posição do timol mais perto das caudas hidrofóbicas do lipídeo, é provável que a falta de nitidez da banda para fosfato deve estar associada à crescente desordem da monocamada.

A literatura mostra alguns exemplos que relatam as propriedades dos terpenos na interface ar-água, com ou sem lipídios. Normalmente, os terpenos com um peso molecular superior podem ser espalhados diretamente na interface ar-água, ao invés de interagindo com lipídios. Na literatura, é relatado que triterpenos pentacíclicos do tipo lupano (lupeol, betulina e ácido betulínico) formam fases cristalinas em suas monocamadas (53).

Esses resultados mostram definitivamente que estes compostos são capazes de se reorganizar na interface quando induzida por um estresse mecânico, como compressão interfacial. Quando os lipídios são co-presentes na interface, esse estresse é causado não só pela compressão da interface ar-água, mas também pela condensação da estrutura supramolecular formada por os lipídios.

A literatura relata a interação de outros triterpenos pentacíclicos monoanfílicos com cardiolipinas e fosfatidilgliceróis extraídos da mitocôndria e membranas bacterianas (54). Eles foram comparativamente caracterizados em monocamadas Langmuir binárias, revelando que algumas delas são capazes de desintegrar os domínios contendo cardiolipina em membranas mitocondriais e bacterianas, o que foi explicado com base no fenômeno da discriminação quiral.

Estes os resultados foram discutidos em referência à atividade biológica dos compostos estudados, apontando que o mecanismo de atividade biológica desses terpenos poderia estar relacionado à membrana e que a carga do aniônica dos fosfolipídios podem ser um fator chave para tal interação.

Outro interessante trabalho com o composto hexadecaprenol, um potencial bactericida, mostrou que este diminui a energia de ativação e aumenta a condutância da membrana e a permeabilidade da membrana modulando a organização molecular da membrana. Os autores sugeriram que o hexadecaprenol modifica as membranas

lipídicas pela formação de microdomínios de fluído, que foi especulado em termos do fato de que o potencial transmembrana elétrico pode acelerar a formação de poros em bicamadas lipídicas modificadas por poliprenóis de cadeia longa (55).

De um modo geral, todos os artigos citados sobre terpenos e compostos semelhantes mostram que tais drogas agem no lipídio da monocamada de Langmuir que representa as membranas celulares, alterando algumas propriedades físico-químicas, como eficácia dos lipídios, aumentando a fluidez da membrana e alterando o momento dipolo total na monocamada.

Para este trabalho, os resultados apresentados também indicam uma interação intrínseca entre timol e DPPC na interface ar-água, o que pode estar relacionado ao uso prospectivo deste composto em processos farmacêuticos que envolvem a interação do timol com as membranas celulares e outras biointerfaces. Embora haja limitação da abordagem do uso de monocamadas de lipídios Langmuir para a compreensão de sistemas tão complexos, é importante mencionar que as interações de tais compostos podem diferir com as interações em relação às bicamadas, mas possa fornecer todavia uma primeira pista sobre o mecanismo da droga com a camada mais externa da célula.

Por fim, enfatizamos que estes resultados podem ser valiosos para analisar sistemas da membrana de droga, levando em consideração sua estrutura molecular e o aspecto físico-químico, assim como as características dos modelos empregados, como membrana organização, partição, expansão do filme, superfície reológica propriedades e localização preferencial do medicamento. Os efeitos observados neste artigo emergem do arranjo supramolecular do sistema, que não é simples por usar abordagens farmacêuticas clássicas.

## 6.0 Conclusões

Neste trabalho, a interação do timol com o modelo membranas na interface ar-água foi estudada com tensiometria, espectroscopia infravermelha, microscopia e simulação molecular, com foco em valores de pressão de superfície que se aproximam pressões laterais da membrana natural. A droga timol foi comprovadamente incorporada em um modelo simplificado da membrana celular de camada externa em um experimento de prova de conceito. Este composto expande monocamadas de DPPC, diminui sua elasticidade de superfície, e, portanto, altera as propriedades físico-químicas dos filmes. Uma localização preferencial termodinâmica da droga ao longo do modelo de biomembrana pode ser inferido estar perto das caudas hidrofóbicas de DPPC. Esperamos que esses resultados tenham um impacto significativo na compreensão da interação entre o timol e as superfícies da membrana celular, que podem ser útil para acessar informações moleculares sobre produtos farmacêuticos e as propriedades deste medicamento.

## **7.0 Referências Bibliográficas**

- (1) Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. E. *Molecular cell biology*. New York: W. H. Freeman and Company, 1999.
- (2) Yeagle, P. L. *The membrane of cells*, San Diego: Academic Press, 1993.
- (3) Petty, H. R. *Molecular Biology of membranes: structure and function*. New York: Plenum Press, 1993.
- (4) Shinitzky, M. *Biomembranes: structural and functional aspects*. Weinheim: VCH, 1994
- (5) Lipowsky, R.; Sackmann, E. *Handbook of biological physics: volume 1A: structure and dynamics of membranes*. New York: Elsevier Science, 1995.
- (6) Jones, M. N.; Chapman, D. *Micelles, monolayers and biomembranes*. New York: Wiley-Liss, Inc., 1994.
- (7) Alberts, B. et al. "Fundamentos da biologia celular". 2011, 3. ed. 864 p., Porto Alegre: Artmed
- (8) Leekumjorn S.; Sum A. K. "Molecular Simulation Study of Structural and Dynamic Properties of Mixed DPPC/DPPE Bilayers". *Biophysical Journal*, 2006; v. 90, n. 11, p. 3951-3965.
- (9) Langmuir, I. "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquidis". *Journal of the American Chemical Society*, 1917, v. 39, n. 9, p. 1848- 1906
- (10) Blodgett, K. "Monomolecular films of fatty acids on glass". *Journal of the American Chemical Society*, 1934, v. 56, p. 495-495.
- (11) Ferreira, Marystela et al. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). *Química Nova*, p. 502-510, 2005.
- (12) Greene, J. E.; *Phys Today*. 67 (2014) 43.
- (13) Rayleigh; Pockels, A.; *Nature*. 43 (1891) 437.
- (14) Stefaniu, C.; Brezesinski.; Mohwald, H.; *Adv colloid interface*. 208 (2014) 197.
- (15) Brockman, H.; *Current Opinion in Structural Biology* 9 (1999) 438.
- (16) Shaw, D. J. "Introdução à Química dos Coloides e de Superfícies", 1992, 185 p., São Paulo: Edgard Blucher e Universidade de São Paulo.
- (17) Greenler, R. G.; *J Chem phys*. 44 (1966) 310
- (18) Volpati, D.; Aoki, P. H. B.; Alessio, P.; Pavinatto, F. J.; Miranda, P. B.; Constantino, C. J. L.; Oliveira Jr, O. N.; *Adv Colloid interface*. 207 (2014) 199.
- (19) Mendelsohn, R.; Mao, G. R.; Flach, C. R. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1798 (2010) 788.
- (20) Kaercher, Thomas; HÖNIG, Dirk; MÖBIUS, Dietmar. Brewster angle microscopy. *International ophthalmology*, v. 17, n. 6, p. 341-348, 1993.
- (21) Molina, Ramón. Boron Nitride and Carbon Nanostructures: Synthesis, Characterization and Ab Initio Calculations. Thesis (Doctorate institutional on materials Science and engineering) – Universidade Autonoma de San Luis Potosi, México, p.51.2015
- (22) B. J. Alder, T. E. Wainwright, *J. Chem. Phys.* 31, 459 (1959)

- (23)M. P. Allen, D. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids* (Clarendon Press, Oxford, 1987).
- (24)D. Frenkel, B. Smit, *Understanding Molecular Simulation from Algorithms to Applications*, (Academic Press, San Diego, 1996)
- (25)L. J. A. Siqueira, *Dinâmica Molecular de Eletrólitos Poliméricos*, 2005. Tese de Doutorado
- (26)Viegas Jr, C., Bolzani, V. da S. & Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova* 29, 326–337 (2006).
- (27)Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím Nova* 25: 45-61
- (28)Saad, G.A. et al. *Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 402p.
- (29)Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475 (2008).
- (30)Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P; Mentz, L.A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.
- (31)Dubey, V.S.; Bhalla, R.; Luthra, R.; An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.*, 28, 637–646, 2003.
- (32)Peixoto-Neves D.; Silva-Alves, K.S.; Gomes, M.D.; Lima, F.C.; Lahlou, S.; Magalhães, P.J.; Ceccatto, V.M.; Coelho-De-Souza, A.N.; Leal-Cardoso, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 24, 341-350, 2010.
- (33)Nostro, A. and Papalia, T. (2012) Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7, 28-35.
- (34)Friedrich, C. Pharmacists in German Cultural History. *An. Real Acad. Farm.*, 80, 600- 613, 2014.
- (35)Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.; Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453–462, 2001.
- (36)Nostro, A.; Papalia, T.; Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 7, 28-35, 2012.
- (37)Holland, R.D.; Wilkes, J.G.; Cooper, W.M.; Alusta, P.; Williams, A.; Pearce, B.; Beaudoin, M.; Buzatu, D. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 28, 2617– 2626, 2014.

- (38) Cristani, M.; d'Arrigo, M.; Mandalari, G.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Micieli, D.; Venuti, V.; Bisignano, G.; Saija, A.; Trombetta, D. Interaction of four monoterpenes contained in



- essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6300-6308, 2007.
- (39) Xu, J.; Zhou, F.; Ji, B.P.; Pei, R.S.; Xu, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47, 174–179, 2008.
- (40) Hammer K.A.; Heel K.A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in *Staphylococci* and *Enterococci*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 40, 239-45, 2012.
- (41) La Storia, A.; Ercolini, D.; Marinello, F.; Di Pasqua, R.; Villani, F.; Mauriello, F. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Res. Microbiol.*, 162, 164-172, 2011
- (42) Gill, A.O.; Holley, R.A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 170–174, 2006.
- (43) Di Pasqua, R.; Betts, G.; Hoskins, N.; Edwards, M.; Ercolini, D.; Mauriello, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4863–4870, 2007.
- (44) Ultee, A.; Bennink, M.H.J.; Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561–1568, 2002.
- (45) Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gonterd, N.; Chalier, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 149-154, 2006.
- (46) Braga, P.C.; Culici, M.; Alferi, M.; Dal Sasso, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 31, 472–477, 2008.
- (47) Romero, A.L.; Specian, V.; Oliveira, R.C.; Diniz, S.S.S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 11, 15-8, 2009.
- (48) Juven, B.J.; Kanner, J.; Schued, F.; Weisslowicz, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 626-631, 1994
- (49) Rao, A.; Zhang, Y.; Muend, S.; Rao, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54, 5062–5069, 2010
- (50) Ahmad, A.; Khan, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoor, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 30, 41-50, 2011.

- (51)Lewis, D.L., Farr, C.L., Farquhar, A.L., Kaguni, L.S. (1994). Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 11(3): 523—538
- (52)Dang, L. X.; Wick, C. D. Anion Effects on Interfacial Absorption of Gases in Ionic Liquids. A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem.B* 2011, 115, 6964–6970.
- (53)Broniatowski, M.; Flasiński, M.; Wydro, P. Lupane-Type Pentacyclic Triterpenes in Langmuir Monolayers: A Synchrotron Radiation Scattering Study. *Langmuir* 2012, 28, 5201–5210.
- (54)Broniatowski, M.; Flasiński, M.; Zięba, K.; Miśkowiec, P. Langmuir monolayer studies of the interaction of monoamphiphilic pentacyclic triterpenes with anionic mitochondrial and bacterial membrane phospholipids - Searching for the most active terpene. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2014, 1838, 2460–2472.
- (55)Janas, T.; Nowotarski, K.; Gruszecki, W. I.; Janas, T. The effect of hexadecaprenol on molecular organisation and transport properties of model membranes. *Acta Biochim. Pol.* 2000, 47, 661–673.